

Aus der
Abteilung Kardiologie und Kreislaufkrankungen des
Universitätsklinikum Tübingen
Karl-Eberhards-Universität Tübingen
Direktor Prof. Dr. med. M. Gawaz

Angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. med. A.E. May

Vorgelegt über
Prof. Dr. med. vet. M. Stangassinger
Lehrstuhl für Physiologie am Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**CD147 (EMMPRIN) und dessen Ligand Cyclophilin A bestimmen das Ausmaß des
myokardialen Schadens nach Ischämie/Reperfusion im Mausmodell.**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Carmen Ochmann

aus
Finsterwalde

München, 2010

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Stangassinger
Korreferent/en:	Univ.-Prof. Dr. Hermanns

Tag der Promotion: 24. Juli 2010

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM	2
2.1. Zum Myokardinfarkt	2
2.1.1. Ursachen	2
2.1.2. Pathogenese der Atherosklerose	2
2.1.3. Pathogenese des akuten Myokardinfarkts	4
2.1.4. Reperfusionsschaden	5
2.1.4.1. Freie Sauerstoffradikale	6
2.1.4.2. Veränderungen der Calcium-Homöostase	7
2.1.5. Arrhythmien	8
2.2. Zum Immunglobulin CD147	10
2.2.1. Allgemeines	10
2.2.2. Funktion	11
2.2.2.1. Integration von MCTs (Monocarboxylat-Transporter)	11
2.2.2.2. Produktion von MMPs (Matrix Metalloproteinasen)	12
2.2.2.3. Signalrezeptor für extrazelluläres Cyclophilin A	14
2.2.3. CD147-Knockout-Mäuse	16
2.2.4. CD147 in verschiedenen Krankheitsprozessen	19
2.2.4.1. CD147 in Tumorgeweben	19
2.2.4.2. CD147 bei ischämischen Zuständen	23
2.2.4.3. CD147 bei Morbus Alzheimer	24
2.3. Zum Immunophilin Cyclophilin A	24
2.3.1. Allgemeines	24
2.3.2. CypA-Knockout-Mäuse	25
2.4. Zur Eignung der Maus für das Versuchsmodell Myokardinfarkt	26
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	28
3.1. ZIELVORSTELLUNGEN	28
3.2. MATERIAL UND METHODEN	29
3.2.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen	29
3.2.2. Genotypisierung	30
3.2.3. Übersicht Versuchsplan	31
3.2.4. Operationsdurchführung	34
3.2.4.1. Vorbereitung der Operation	34
3.2.4.2. Tracheotomie	36
3.2.4.3. Thorakotomie und Ligatur der LAD	38

3.2.4.4. Verschluß der Thorakotomie -und Tracheotomiewunde	40
3.2.4.5. Postoperative Versorgung der Maus.....	42
3.2.4.6. Färbung des Herzens zur Bestimmung der Infarktgröße	42
3.2.4.7. Auswertung der Areale.....	45
3.2.5. Sonographische Untersuchung des linken Ventrikels.....	47
Abb.17: Bestimmung der enddiastolischen Fläche des linken Ventrikels.	48
3.2.6. Immunhistochemie.....	49
3.2.6.1. Material	49
3.2.6.2. Methode.....	51
3.2.7. Histologische Untersuchung: Hämatoxylin-Eosin (HE) - Färbung	53
3.2.7.1. Materialien.....	53
3.2.7.2. Methode.....	54
3.2.8. Gewebezymographie	54
3.2.9. Statistische Auswertung.....	56
3.3. ERGEBNISSE.....	57
3.3.1. Untersuchung der CD147-Expression bei CD147-defizienten, heterozygoten Mäusen (CD147 ^{+/-}) vor myokardialer Ischämie/Reperfusion	57
3.3.1.1. Immunhistochemie	57
3.3.1.2. Zymographie	61
3.3.2. Überlebensrate und Komplikationen des chirurgischen Eingriffes.....	62
3.3.3. Versuchsnummer 1	63
3.3.3.1. Infarktgrößen	63
3.3.3.2. HE-Färbung	66
3.3.3.3. Zymographie	67
3.3.4. Versuchsnummer 2	68
3.3.4.1. Echokardiographie.....	68
3.3.4.2. Infarktgröße	70
3.3.4.3. HE-Färbung	74
3.3.5. Versuchsnummer 3	75
3.3.5.1. Infarktgrößen	75
3.3.5.2. Zymographie	78
3.3.5.3. HE-Färbung	79
3.3.6. Versuchsnummer 4	79
3.3.6.1. Echokardiographie.....	80
3.3.6.2. Infarktgrößen	83
3.3.6.3. HE-Färbung	86
3.3.7. Versuchsnummer 5	87
3.3.7.1. Infarktgrößen	87
3.3.7.2. HE-Färbung	90
3.3.8. Versuchsnummer 6	91
3.3.8.1. Echokardiographie.....	91
3.3.8.2. Infarktgrößen	94
3.3.8.3. HE-Färbung	97
4.1. Zur Eignung des Maus-Myokardinfarktmodells.....	99
4.1.1. Die Maus als Versuchstier	99
4.1.2. Das Modell der myokardialen Ischämie/Reperfusion.....	101
4.1.3. Die Echokardiographie zur quantifizierenden Charakterisierung der myokardialen Ischämie/Reperfusion	103

4.2. Zur Anwendung des Maus-Myokardinfarkt-Modells	104
4.2.1. Komplikationsmöglichkeiten.....	104
4.2.2. Die heterozygot defiziente CD147 ^{+/-} Maus als Modellspezifität	105
4.2.3. Der anti-CD147-Antikörper zur modellspezifischen Behandlung	107
4.2.4. Die Cyclophilin A-Knockout-Maus als Modellspezifität	110
4.3. Limitationen dieser Modellstudie.....	111
4.4. Schlussfolgerungen.....	112
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	114
6. SUMMARY	116
7. LITERATURVERZEICHNIS	118
8. TABELLENVERZEICHNIS	137
9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	138
10. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	142
11. DANKSAGUNG.....	145

1. EINLEITUNG

Laut statistischem Bundesamt waren Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die häufigste Todesursache im Jahr 2007. Dabei standen chronisch-ischämische Herzkrankheiten mit 9,3% an erster Stelle der Todesursachen. Darauf folgen der akute Myokardinfarkt mit 7% und die Herzinsuffizienz mit 6%. Insgesamt erlag 2007 fast jeder zweite Gestorbene (43,4%) einer Herz-Kreislauf-Erkrankung (www.destatis.de).

Die finanziellen Aufwendungen für Prävention, Rehabilitation und Pflege von Erkrankten lagen in Deutschland im Jahr 2006 bei insgesamt 236 Milliarden Euro. Davon wurden die höchsten Kosten für Herz-Kreislauf-Erkrankungen (35,2 Milliarden Euro) aufgewendet.

Bei Patienten, die den Myokardinfarkt überstanden haben, kommen zudem im Allgemeinen lange andauernde Krankheitsverläufe hinzu.

Langfristig bedeutet das Überleben eines akuten Myokardinfarkts zumeist eingeschränkte Lebensqualität, Pflegebedürftigkeit oder sogar Invalidität. Da Infarktpatienten oft erwerbsunfähig werden und auf frühzeitige Rente angewiesen sind, hat diese Erkrankung auch finanzielle Folgen für die gesamte Gesellschaft.

Zweck der vorliegenden Studie ist es, pathophysiologische Zustände bei myokardialer Ischämie und Reperfusion zu beeinflussen, um mögliche Behandlungsstrategien zu entwickeln. Dabei ist die Minimierung der Infarktgröße das vorrangige Ziel. Diese ist nicht allein von der Dauer der Ischämie, sondern auch von verschiedenen Einflüssen während der Reperfusion abhängig. Derzeitige Behandlungsstrategie ist die schnellstmögliche Beseitigung der Koronararterienokklusion. Zudem wird versucht, medikamentös die Bildung von weiteren Thromben langfristig zu verhindern. Zusätzlich könnten Humanmediziner durch Substanzen, die die Ausdehnung des Infarktes minimieren, zusätzliche Therapieerfolge erzielen.

Die vorliegende Arbeit gibt Aufschluss darüber, inwiefern und durch welche Mechanismen das CD147-Cyclophilin A-System Auswirkungen auf die Infarktgröße und die Herzfunktion nach myokardialer Ischämie/Reperfusion hat.

Zum einen konnte CD147 als Signalrezeptor für extrazelluläres Cyclophilin A (CypA) identifiziert werden. Somit kann CypA CD147-abhängig chemotaktisch wirkende Signale auf T-Zellen sowie neutrophile und eosinophile Granulozyten ausüben. Die Folge ist die Migration dieser Zellen in das ischämisch geschädigte Gebiet.

Zum anderen ist CD147 in der Lage, die Produktion von Matrix Metalloproteinasen in Fibroblasten und Makrophagen zu induzieren. Durch den Abbau von Extrazellulärer Matrix tragen diese zum myokardialen Remodeling nach einem Myokardinfarkt bei.

Somit trägt CD147 über zwei unterschiedliche Mechanismen zur Pathophysiologie des akuten Myokardinfarktes bei. Ziel dieser Studie ist, herauszufinden, inwiefern ein CD147-Knockdown, eine CD147-Hemmung bzw. ein CypA-Knockout Auswirkungen auf die Infarktgröße und Herzfunktion nach myokardialer Ischämie und Reperfusion hat. Daraus könnten neue Therapieansätze für Patienten mit einem Myokardinfarkt entstehen.

2. SCHRIFTTUM

2.1. Zum Myokardinfarkt

2.1.1. Ursachen

Ein Myokardinfarkt wird durch Durchblutungsstörungen der Koronargefäße ausgelöst. Es entsteht eine Ischämie, die zur Nekrose der distalen Bereiche des Myokards führen kann.

Die Minderdurchblutung der Koronargefäße kann ausgelöst werden durch Neoplasien, Embolien, Verbrauchskoagulopathie (DIC), langanhaltenden Spasmen bei Prinzmetal-Angina oder Polyarteritis nodosa.

Die häufigste Ursache jedoch ist die Ruptur einer vulnerablen atherosklerotischen Plaque.

2.1.2. Pathogenese der Atherosklerose

Atherosklerotische Gefäßveränderungen können durch thrombotischen Verschluss eines Koronargefäßes und akute Unterbrechung der Sauerstoffversorgung einen Myokardinfarkt auslösen.

Die WHO definiert Atherosklerose als eine Erkrankung, die Eigenschaften einer chronischen Entzündung aufweist und an großen sowie mittelgroßen Arterien auftritt. Sie ist gekennzeichnet durch herdförmige Anhäufungen von Lipiden und diffuse Anhäufungen von Kollagenfasern (www.path.med.tum.de).

Die Entstehung dieser Erkrankung ist ein komplexer Vorgang, der durch die genetische Herkunft sowie andere potentiell beherrschbare Faktoren beeinflusst wird. Zu den vererbten Faktoren gehören Hypertonie, ein erhöhter Cholesterinspiegel, Adipositas, Diabetes mellitus, Myokardinfarkt und Schlaganfall. Die zweite Form der Risikofaktoren beinhaltet vor allem Bewegungsmangel, Stress, Nikotinabusus, Adipositas und Luftbelastung (LUSIS AJ 2000, LUSIS AJ et al. 2004).

An erster Stelle der Pathogenese steht die Aktivierung von Endothelzellen der Gefäßwandintima. An Arterienverzweigungen, -abzweigungen und -stenosen ist der laminare Blutfluss gestört und es treten veränderte Scherkräfte auf. Diese führen zur Endothelschädigung und -dysfunktion. An diesen Prädilektionsstellen für die Entstehung atherosklerotischer Plaques zeigt das Endothel eine erhöhte Permeabilität (LUSIS AJ et al. 2004).

Eine herausragende Rolle bei der Entstehung spielen die cholesterinreichen Lipoproteine des Plasmas, v.a. LDL (low-density-lipoprotein) und VLDL (very low-density-lipoprotein). Steigen die Plasmaspiegel dieser Lipoproteine, können die Lipoproteine in großen Mengen an Prädispositionsstellen in die Arterienwand eindringen und in der Extrazellulären Matrix verweilen. Durch oxidative und chemische Modifikationsprozesse werden von den LDL bioaktive Phospholipide freigesetzt, die die Endothelzellen aktivieren. Daraus resultiert die Expression von Zelladhäsionsmolekülen, wie VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) auf Endothelzellen (KITA T et al. 1990; LI H et al. 1993; YOUNG SG und PARTHASARATHY S 1994; SKALEN K et al. 2002).

Adhätierende Monozyten dringen mit Hilfe von MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) in die Intima der Gefäßwand ein. Eingewanderte Monozyten differenzieren sich unter Einfluss von M-CSF (macrophage colony stimulating factor) zu Makrophagen (SMITH JD et al. 1995). Dieser Vorgang ist assoziiert mit der Ausbildung von Scavenger-Rezeptoren und Toll-like-Rezeptoren (HANSSON GK et al. 2002).

Sobald Toll-like-Rezeptoren an potentiell pathogene Moleküle, z.B. Bakterientoxine, binden, kommt es zur Aktivierung der Makrophagen. Diese setzen proinflammatorische Mediatoren frei und können so bestimmte Entzündungskaskaden auslösen (HANSSON GK et al. 2002; JANEWAY C Jr. et al. 2002).

Scavenger-Rezeptoren führen zur Endozytose der modifizierten Lipoproteine, die im Zytoplasma der Makrophagen Fetttropfen bilden. Somit wandeln sich die Makrophagen in Schaumzellen um (PEISER L et al. 2002). Desweiteren können durch diese Rezeptoren auch pathogene Stoffe, wie Bakterientoxine oder apoptotische Zellfragmente aufgenommen werden. Zudem wird die Aktivierung des Endothels durch Aufnahme des oxidierten LDLs vermindert. Folglich kann den Makrophagen neben ihrer proinflammatorischen Funktion auch eine antiinflammatorische Rolle zugesprochen werden (HANSSON GK 2006).

Die Ansammlung solcher Schaumzellen in der Intima führt zur Bildung von so genannten „Fatty streaks“, die dem frühen Stadium der Atherosklerose entsprechen. Aus diesen kann sich langfristig eine atherosklerotische Plaque mit dem typisch nekrotischen Lipidkern und einer fibrösen Kappe entwickeln.

Von Makrophagen freigesetzte Wachstumsfaktoren führen zur Wanderung glatter Muskelzellen von der Media in die Intima. Dort kommt es zur Proliferation dieser Zellen und zur Sekretion von Kollagen (LUSIS AJ et al. 2004). Die Folge ist eine Verfestigung der Gefäßwand, Wachstum der atherosklerotischen Läsion und Lumeneinengung. So entstehen aus „Fatty streaks“ frühe Atherome, die aus einem nekrotischen Kern und einer fibrösen Kappe bestehen. Der Kern ist eine Höhle in der Plaque, die vor allem mit apoptotischen Schaumzellen, aber auch anderem nekrotischem Material gefüllt ist. Die Kappe ist eine fibrozelluläre Struktur aus kollagenreicher extrazellulärer Matrix und glatten Muskelzellen, die den nekrotischen Kern vom Blut trennt.

Diese Atherome werden mit der Zeit komplexer und enthalten zunehmend Kalzifizierungen und Hämorrhagien durch eingesprossete Mikrogefäße (SCHWARTZ SM et al. 2007). Dabei wird die Kappe dünner. Durch Ruptur einer vulnerablen Plaque erhält der nekrotische Kern Kontakt zum Blutstrom. Durch Anlagerung von Thrombozyten und Fibrin bildet sich ein Thrombus (CONSTANTINIDES P 1964; SCHWARTZ SM et al. 2007).

Je nach Größe dieses aufgelagerten Thrombus kann es zur plötzlichen Unterbrechung des Blutflusses kommen und ein Myokardinfarkt oder andere Folgeerkrankungen können ausgelöst werden.

SHAH et al. zeigten, dass in der Plaque befindliche aktivierte Makrophagen den Kollagenabbau der fibrösen Kappe induzieren, indem sie Matrix Metalloproteinasen und eventuell andere Proteasen sezernieren (SHAH PK et al. 1995).

2.1.3. Pathogenese des akuten Myokardinfarkts

Durchblutungsstörungen der Koronargefäße führen zu einer unzureichenden Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Myokards und zudem zu einem mangelnden Abtransport von Stoffwechselnebenprodukten.

Das Angebot an ATP verringert sich, Reserven an Glykogen sind erschöpft. Die aerobe Glykolyse wird zu einer anaeroben umgestellt, es kommt zur Anhäufung von Protonen, Laktat und anorganischem Phosphat. Die Kontraktilität der Zellen ist gestört (JENNINGS RB et al. 1983; JENNINGS RB 1991). Der Bedarf der Myozyten an Energie übersteigt bei weitem die Bereitstellung durch anaerobe Glykolyse. Aufgrund der Ansammlung osmotisch wirksamer Stoffe sinkt der intrazelluläre pH-Wert. Es entsteht ein osmotischer Druck, der zum Eindringen von Wasser in die Zelle führt. Die Folge ist ein Anschwellen der Zelle (JENNINGS RB et al. 1985).

Schließlich sammelt sich infolge der gestörten Elektrolythomöostase Ca^{2+} im Intrazellularraum an. Endogene Phospholipasen werden aktiviert, diese tragen zur Schädigung der Plasmamembran bei (NAYLER WG und ELZ JS 1986). Zelleigene Schutzmechanismen, wie Superoxid-Dismutase, verlieren an Aktivität (FERRARI R et al. 1985). Es kommt zur Akkumulation freier Radikale, die Lipidbestandteile der Plasmamembran peroxidieren (NAYLER WG und ELZ JS 1986).

Unter dem Elektronenmikroskop können bei ischämischen Schaden folgende Zellcharakteristika erkannt werden: Veränderungen der Plasmamembran, geschwollene Mitochondrien, fehlendes Glykogen und die Randstellung des nukleären Chromatins (NAYLER WG und ELZ JS 1986).

Risse in der Plasmamembran markieren den Zeitpunkt, an dem die reversible Phase der Ischämie in die irreversible übergeht. Sobald ein Kardiomyozyt eine Läsion in der Zellmembran besitzt, ist er irreparabel geschädigt (JENNINGS 1978, in STEENBERGEN C et al. 1985). Ein solcher irreversibel geschädigter Myozyt ist zudem gekennzeichnet durch einen sehr geringen ATP-Gehalt, Beenden der anaeroben Glykolyse, große Mengen an Protonen, AMP, Laktat, anorganischen Phosphaten und einen erhöhten osmotischen Druck (REIMER KA et al. 1981; JENNINGS RB und REIMER KA 1991).

Insgesamt kann die myokardiale Ischämie als eine Unausgewogenheit zwischen Sauerstoffzufuhr und Verbrauch durch zelluläre Oxidation angesehen werden. Dabei spielt die Dauer der Ischämie eine entscheidende Rolle. Kurze Phasen werden von den Myozyten

toleriert und führen zu reversiblen Schäden. Nach der Reperfusion ist die Funktion des betroffenen Myokardareals kurzzeitig beeinträchtigt. Dies wird als „stunned myocardium“ bezeichnet. Nach langer schwerwiegender Ischämie entstehen irreversible Schädigungen. Die ursprüngliche Kontraktilität des Myokards wird auch nach Reperfusion nie wieder hergestellt. Ist die Durchblutungsstörung lang andauernd aber nicht vollständig, entsteht ein Zustand, der als „hibernating myocardium“ bezeichnet wird. Die Kontraktilität des Gewebes wird während der Ischämie eingeschränkt, kann nach Reperfusion aber wiederhergestellt werden (FERRARI R 1995). KLONER und JENNINGS vermuten, dass die Aktivität des Myokards während der Ischämie herunter reguliert wird, um das Überleben der Myozyten zu sichern (KLONER RA, JENNINGS RB 2001). Demgegenüber stellen die Myozyten beim so genannten „stunned myocardium“ ihre Kontraktion bereits wenige Sekunden nach Einsetzen der Ischämie ein. Nach Reperfusion benötigt das geschädigte aber lebensfähige Gewebe Stunden bis Tage um die ursprüngliche Funktion wieder vollständig herzustellen (FERRARI R et al. 1998; KLONER RA und JENNINGS RB 2001). Dabei ist die Dauer der Funktionseinschränkung abhängig von der Dauer und Schwere der Ischämie sowie einer ausreichenden Reperusionsmenge (KLONER RA et al. 1983 in KLONER RA et al 2001).

2.1.4. Reperfusionsschaden

Reperfusion des koronaren Blutflusses ist notwendig, um die ischämischen Bereiche wieder mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen zu können. Dieses Vorgehen wird auch bei humanen Myokardinfarkten in Form einer Thrombolyse oder auf mechanischem Wege (Einbringen eines Herzkatheters und anschließende Ballonaufdehnung, zusätzliche Stabilisierung durch einen Koronar-Stent) vollzogen. Die zeitnahe Reperfusion bewahrt die Kardiomyozyten vor ischämischen Schäden oder Nekrosen. Paradoxerweise kann die Reperfusion jedoch auch Schäden oder Zelltod der Kardiomyozyten hervorrufen. Diese Erscheinung wird als Reperfusionsschaden bezeichnet (VERMA S et al. 2002). Der Reperfusionsschaden manifestiert sich im bereits beschriebenen „myocardial stunning“, Zellnekrosen oder in mikrovaskulären und endothelialen Zellschäden. Es wird unterschieden zwischen a) denjenigen Zellen, die durch die Ischämie bereits irreversibel geschädigt waren und deren Zelltod durch die Reperfusion nur beschleunigt wird und b) den reversibel geschädigten, lebensfähigen Zellen, die durch die Reperfusion irreversibel geschädigt werden. Diese pathologischen Veränderungen werden jedoch erst nach Reperfusion sichtbar und lassen sich dann nur noch schwer voneinander abgrenzen (NAYLER WG und ELZ JS 1986). Wichtige Mechanismen des Reperfusionsschadens sind die freien Sauerstoffradikale sowie Veränderungen der Calcium-Homöostase (VERMA S et al. 2002).

2.1.4.1. Freie Sauerstoffradikale

Ein Radikal ist charakterisiert durch ein ungepaartes Elektron im äußeren Orbital, welches eine hohe Reaktivität und kurze Lebensdauer hat, da diese Situation energetisch instabil ist. Energetische Stabilität wird durch Oxidation eines anderen – stabilen - Moleküls erreicht, wodurch dieses wiederum ein ungepaartes Elektron besitzt (MAXWELL SRJ und LIP GYH 1997; FRANGOIANNIS NG et al. 2001). Freie Sauerstoffradikale werden nach Einsetzen der Reperfusion durch Enzyme, wie Xanthin-Oxidase, Cytochrom-Oxidase und durch die Oxidation der Cyclooxygenase gebildet (VERMA S et al. 2002). Zudem stammen viele freie Radikale vom NADPH-Oxidase-System aus der Zellmembran stimulierter polymorphkerniger Leukozyten (KAMINSKI KA et al. 2002).

Die wichtigste Quelle dieser Radikale ist jedoch das Enzym Xanthin-Dehydrogenase/-Oxidase. In gesundem Gewebe liegt es als Dehydrogenase-Form zur Oxidation von Xanthin vor. Bei Ischämie wird durch den intrazellulären Calcium-Überschuss eine Calcium-abhängige Protease aktiviert, die die Dehydrogenase zu einer Oxidase umwandelt. Diese bildet aus Xanthin und molekularem Sauerstoff Superoxid-Anion-Radikale. Aufgrund der Anhäufung von Xanthin und Hypoxanthin aus AMP zu Beginn der Reperfusion steht diesem Enzym viel Substrat zur Verfügung (MAXWELL SRJ und LIP GYH 1996).

Durch Reaktion dieser freien Radikale mit ungesättigten Fettsäuren entstehen Peroxide, die das Sarkolemm der Zellen schädigen. Zudem dämpfen freie Radikale die Stickoxid-Synthese und stimulieren die Expression von PAF (Thrombozyten-aktivierender Faktor) durch Endothelzellen, wodurch Neutrophile angelockt werden können (VERMA S et al. 2002). Unter physiologischen Bedingungen wird Stickoxid – ein kardioprotektiver Faktor – ständig von Endothelzellen freigegeben und es bestehen keine Interaktionen zwischen Endothelzellen und neutrophilen Granulozyten. Nach Ischämie-Reperfusion ist die Stickoxid-Freisetzung verringert, wodurch eine Vasokonstriktion ausgelöst wird („no reflow“-Phänomen). Durch Exozytose der Weibel-Palade-Bodies können Endothelzellen das darin befindliche P-Selectin exprimieren. Dieses führt zur 1. Phase der Einwanderung polymorphkerniger Neutrophiler (PMN), dem sogenannten Rollen. Es entsteht durch die geringe Affinität des P-Selectins der Endothelzellen zum PSGL-1 (P-Selectin Glykoprotein Ligand-1) der Neutrophilen. Die PMN werden langsamer und es entstehen Interaktionen zwischen deren CD18 und ICAM-1 (inter-cellular adhesion molecule 1) der Endothelzellen. ICAM-1 wird ständig von Endothelzellen exprimiert, kann aber durch Stimulation, z.B. durch Zytokine gesteigert werden (KUKIELKA GL et al. 1993). Somit beginnt die frühe Adhäsion, die die 2. Phase der PMN-Einwanderung darstellt. Schließlich kommt es zur 3. Phase: der Diapedese mittels PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) durch die gap junctions der Endothelzellen. Sobald diese Zellen den ischämischen Bereich erreicht haben, wirken sie dort proinflammatorisch und tragen erheblich zum Reperfusionsschaden bei (JONES SP und LEFER DJ 2000).

2.1.4.2. Veränderungen der Calcium-Homöostase

Die intrazelluläre Calcium-Konzentration ist während länger andauernder Ischämie erhöht. Dieser Zustand verschlimmert sich bei Reperfusion, vor allem bei Mitochondrien führt die erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration zu einem veränderten Membranpotential und kann eine Apoptose auslösen. Zudem wird durch den transmembranären Ionentransport, der das Calcium in den Extrazellulärraum befördern soll, viel Energie verbraucht. Dieser Vorgang kann zur sogenannten „Entkopplung“ des Verhältnisses zwischen Sauerstoffverbrauch und Kontraktion im post-ischämischen Herzmuskel führen.

Die zwei Mechanismen Calcium-Overload und freie Sauerstoffradikale sollten nicht voneinander getrennt, sondern eher als ganzheitliches System betrachtet werden.

Ein Calciumüberschuss in der Zelle kann die Freisetzung von Sauerstoffradikalen fördern, indem er die Elektronentransportabläufe beeinträchtigt und zum Ausströmen freier Radikale führt. Zudem führt die Aktivierung einer von Calcium abhängigen Protease zur Bildung von Xanthin-Oxidase, die freie Radikale produziert (MAXWELL SRJ und LIP GYH 1996).

Es existieren jedoch auch endogene Antioxidantien, die vor freien Sauerstoffradikalen schützen, wie die Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase und Glutathion-Peroxidase. Im Myokardinfarktmodell der Maus konnten JONES et al. feststellen, dass eine Überexpression von Mn-SOD das Ausmaß myokardialer Schäden verringert (JONES SPJ et al. 2003). Zudem wurde nachgewiesen, dass kardioprotektive Effekte dieser Antioxidantien abhängig sind von der Reperfusion des ischämischen Herzens, da keine abmildernden Effekte auftraten, sofern das Herz ausschließlich einer Ischämie ausgesetzt war. Hierbei wurde ein SOD-Mimetikum eingesetzt, welches nach Ischämie/Reperfusion zu einer Reduktion des Ischämieareals, verminderter Einwanderung von Neutrophilen und zu einer Verringerung von Arrhythmien führte (MASINI E et al. 2002).

Nichtsdestotrotz fördert die Reperfusion die Reparatur des ischämischen Myokards. Obwohl bei Ischämie/Reperfusion noch sechs Wochen später Funktionseinschränkungen des linken Ventrikels sowie eine Hypertrophie erkennbar sind (PATTEN RD et al. 1998), führt die fehlende Reperfusion langfristig zu einer größeren Dysfunktion und einer stärker ausgeprägten Hypertrophie des linken Ventrikels. Somit scheint die Reperfusion durch einen beschleunigten Beginn der Entzündung auch die Reparaturprozesse zu beeinflussen (MICHAEL LH et al. 1999; DE CELLE T et al. 2004).

2.1.5. Arrhythmien

Die größte Gefahr des akuten Myokardinfarkts ist der plötzliche Herztod; 75-80% dieser Fälle werden durch einen Herzinfarkt ausgelöst (LOPSHIRE 2006). Allerdings kommen durch den schnellen Herztod die klinischen Symptome des Myokardinfarktes oft erst gar nicht zum Vorschein (MEHTA D et al. 1997).

Der plötzliche Herztod ist die Folge von Kammerflimmern. Dieses ist durch eine unkoordinierte Erregungsausbreitung im Myokard gekennzeichnet. Die fehlende Pumpleistung kann zu einem tödlichen Kreislaufstillstand führen. Da die einzelnen Fasergruppen nicht gleichlaufend erregt werden, bleibt das Flimmern erhalten, weil die unkoordinierten Impulse immer wieder neue Fasern erregen (ENGELHARDT W und BREVES G 2000).

Das Auftreten von Arrhythmien und Kammerflimmern ist zumeist die Folge des Verschlusses von Koronararterien. Die Hypoxie führt zu Schädigungen des Myokards und mechanischen, elektrischen sowie biochemischen Dysfunktionen, die zu unkoordinierten Erregungsausbreitungen im Herzen führen können (LUQMAN N et al. 2006). Diese treten zum großen Teil schon kurz nach Einsetzen der Ischämie auf. JANSE konnte in isolierten Schweineherzen, denen die „left anterior descending artery“ (LAD) proximal ligiert wurde, bereits zwei bis acht Minuten nach Ligatur bei 72% der Herzen verfrühte Herzkontraktionen, bei 45% Tachykardien und bei 32% der Herzen Kammerflimmern beobachten (JANSE et al. 1980; zitiert in JANSE M J und KLEBER AG 1981).

Eine weitere Ursache für die Entstehung von Arrhythmien ist das Einsetzen der Reperfusion. Bereits 1935 beobachteten TENNANT und WIGGERS (zitiert in HACKETT D et al. 1990), dass Kammerflimmern auftritt, sobald der Blutfluss einer ligierten Koronararterie wiederhergestellt wird. Dabei ist die Anfälligkeit des Herzens für Arrhythmien abhängig von der Dauer der Ischämie, Größe des Ischämieareals, Schnelligkeit der Reperfusion und Sauerstoffgehalt des Reperfusats (WITKOWSKI F und CORR PB 1984; zitiert in HACKETT D et al. 1990).

Das physiologische Aktionspotential des Herzens wird in vier Phasen eingeteilt.

Phase 0 ist die Depolarisation. Durch eine ankommende Erregung wird der Natriumeinstrom durch potential- und zeitgesteuerte Natriumkanäle und damit auch die Depolarisation in Gang gebracht. Zudem erfolgt ein Calcium-Einstrom durch zeit- und potentialgesteuerte Calcium-Kanäle, der zu einer Calcium-Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum führt. Größe und Dauer des Aktionspotentials beeinflussen die Calcium-Freisetzung und damit auch Stärke und Dauer der Kontraktion. Das Calcium tritt durch spezifische Calcium-Kanäle des Sarkoplasmatischen Retikulums in das Cytoplasma aus und bindet teilweise an Proteine, wie Troponin C. Dies führt zur Kontraktion der Zelle. Steigt die Calcium-Konzentration in der Zelle an, wird eine Calcium-Pumpe im Sarkoplasmatischen Retikulum aktiviert, die das Calcium unter ATP-Verbrauch zurück transportiert.

Phase 1 (= initiale Repolarisation) ist gekennzeichnet durch die Aktivierung eines unspezifischen Kationenkanals, der am Ende der Depolarisation einen kurzen Kaliumausstrom ermöglicht. Es kommt zur initialen Repolarisation.

In Phase 2 oder Plateauphase werden durch einen Natrium-Calcium-Austauscher Natriumionen in die Zelle und Calciumionen in den extrazellulären Raum transportiert. Die dadurch unausgeglichene Ladungsverteilung wird durch einen Kalium-Ausstrom ausgeglichen.

Phase 3 ist die Repolarisation, die sich durch einen allmählich beginnenden Kalium-Ausstrom durch verschiedene spezifische Kaliumkanäle auszeichnet.

Phase 4 (das Ruhepotential) wird durch hohe Permeabilität eines Kaliumkanals stabilisiert (ENGELHARDT W und BREVES G 2000).

Bei Ischämien sind alsbald folgende Veränderungen in der Ionenverteilung auffällig: der Kalium-Ausstrom in den extrazellulären Raum und der Anstieg von Calciumionen in der Zelle. Beide Vorgänge können Arrhythmien oder Kammerflimmern auslösen. Fördernd wirken Katecholamine sowie das zelluläre Abkoppeln durch Dephosphorylierung des „gap junction“-Proteins Connexin 43. Auch Thrombin kann durch Aktivierung des Natrium-Calcium-Austauschers und damit erhöhter intrazellulärer Natrium-Konzentration die Anfälligkeit für Arrhythmien steigern (YAN G et al. 1995).

Es existieren zwei Arten von Kammerflimmern: Den schnellen Typ I und den langsamen Typ II, wobei Typ I in Typ II übergehen oder beide gleichzeitig vorkommen können.

Kammerflimmern ist charakterisiert durch verschiedene Erregungswellen, die durch das Myokard zirkulieren. Es gibt zwei Hypothesen der Wellenfortleitung: In der „multiple wavelet hypothesis“ wird das Kammerflimmern durch viele kleine wandernde Erregungswellen verursacht. Diese kollidieren miteinander, brechen auseinander und verursachen so ein inhomogenes, chaotisches Erregungsmuster. Wellenursprünge sind instabil und haben eine kurze Lebensspanne, sogenannte „Re-entries“ sind vorhanden. Dabei handelt es sich um refraktäre und somit die Leitung blockierende Myokardgebiete, um die die Erregungswelle kreist.

In der „focal source hypothesis“ gibt es einen stabilen Ursprung, der als alleinige Quelle der instabilen Erregungswellen dient und damit Auslöser für das Kammerflimmern ist. (WU T et al. 2002).

Klinisch werden zurzeit folgende Präparate zur Therapie von Arrhythmien bevorzugt eingesetzt: ACE-Hemmer, Aspirin, β -Blocker und Aldosteron-Hemmer.

2.2. Zum Immunglobulin CD147

2.2.1. Allgemeines

CD147 wurde erstmals vor ungefähr 25 Jahren auf Tumorzellen epithelialen Ursprungs entdeckt (BISWAS C 1982). BISWAS stellte fest, dass Cokulturen von Kaninchenfibroblasten und Maustumorzellen epithelialen Ursprungs eine erhöhte Kollagenaseproduktion aufweisen. Er vermutete, dass Tumorzell-Interaktionen zur Freisetzung eines Faktors führen, der angrenzende Fibroblasten stimuliert, Kollagenasen zu produzieren. Daher stammt auch der ursprüngliche Name TCSF: “ Tumor cell-derived collagenase stimulatory factor“ (BISWAS C 1987).

Da TCSF fähig ist die Produktion von Matrix-Metalloproteinasen zu induzieren, wurde es schließlich umbenannt in CD147 (EMMPRIN). EMMPRIN ist die Kurzbezeichnung für „extracellular matrix metalloproteinase inducer“ (BISWAS C und NUGENT MA 1987).

Es wurde später unabhängig voneinander in verschiedenen Spezies nachgewiesen.

Daher entstanden weitere Synonyme: Basigin und gp42 in der Maus (ALTRUDA F et al. 1989), M6 beim Menschen (KASINRERK W et al. 1992), Neurothelin (SCHLOSSHAUER B und HERZOG KH 1990) und HT7 im Huhn (SEULBERGER H et al. 1992), sowie ox-47 in der Ratte (FOSSUM S et al. 1991).

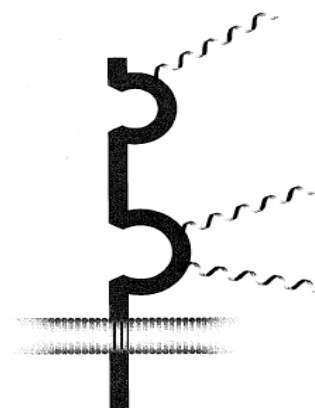
Bei CD147 handelt es sich um ein transmembranales Glykoprotein, welches zu den Immunglobulinen zählt. Der extrazelluläre Anteil besteht aus zwei immunglobulinähnlichen Domänen und ist aus 187 Aminosäuren aufgebaut. Die kurze zytoplasmatische Domäne besteht aus 40 Aminosäuren. Die Transmembranaldomäne enthält 24 Aminosäuren (siehe Abb.1) (FOSSUM S et al. 1991; KASINRERK W et al. 1992). Sie ist zwischen den verschiedenen Spezies hoch konserviert: 96% zwischen Mensch, Maus und Huhn (MIYAUCHI T et al. 1991). Dabei können hydrophobe Aminosäuren einen geladenen Rest besitzen, der nicht in die Proteinverbindungen der Plasmamembran assoziiert ist. Da diese Situation energetisch instabil ist, ist anzunehmen, dass CD147 mit anderen Membranproteinen, sowie intra- und extrazellulären Faktoren interagiert (JIANG J und TANG J 2007).

Das Molekulargewicht von CD147 schwankt zwischen 35 bis 64kDa, abhängig vom Grad der Glykosilierung. Diese schwankt zwischen den einzelnen Zellen. Der Proteinkern allein hat ein Molekulargewicht von 27kDa (KASINRERK W et al. 1992).

Abb.1: Strukturmodell des CD147-Proteins:

Die Loops stellen die Immunglobulin-ähnlichen Domänen dar, die Helices stehen für gebundene Oligosaccharide.

(aus MURAMATSU T und MIYAUCHI T 2003)



Das Vorkommen von CD147 ist nicht auf Tumorzellen beschränkt, sondern ubiquitär. Bisher konnte es auf hämatopoetischen, epithelialen und endothelialen Zellen nachgewiesen werden (FOSSUM S et al. 1991).

CD147 hat Anteil an physiologischen Vorgängen, wie embryonaler Entwicklung, Retinafunktion, Reproduktion, T-Lymphozytenreifung im Thymus (RENNO T et al. 2002) und neuronaler Entwicklung (IGAKURA T et al. 1996; IGAKURA T et al. 1998; KASINERK W et al. 1999). Allerdings ist es auch an pathologischen Prozessen beteiligt. Während die Expression von CD147 in gesundem Gewebe auf niedrigem Level liegt, steigt sie bei pathologischen Prozessen stark an. CD147 ist beteiligt an Prozessen, wie der Atherosklerose (HAUG C et al. 2004), Erkrankungen des Herzens (SPINALE FG et al. 2000) oder entzündlichen Lungenerkrankungen (FODA HD et al. 2001; BETSUYAKU T et al. 2003). Es hat Anteil am Fortschreiten der rheumatoiden Arthritis, wo es vor allem auf der Synovialmembran nachgewiesen werden konnte (TOMITA T et al. 2002). Weiterhin induziert CD147 die MMP-Produktion in Fibroblasten und trägt damit zum Tumorwachstum bei (KATAOKA H et al. 1993).

Zudem spielen CD147 und Matrix Metalloproteinasen (MMPs) eine wichtige Rolle beim Auf- und Abbau der Extrazellulären Matrix während des Menstruationszyklus. Dabei ist die Expression und Glykosylierung von CD147 abhängig vom Progesterongehalt (NOGUCHI Y et al. 2003).

2.2.2. Funktion

Wie schon beschrieben hat CD147 zahlreiche Funktionen und ist an einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Vorgängen beteiligt. Es dient zur Integration von Monocarboxylat-Transportern, induziert die Produktion von Matrix Metalloproteinasen und wurde als Signalrezeptor für extrazelluläres Cyclophilin identifiziert. Es interagiert mit Integrinen (BERDITCHEVSKI F et al. 1997) und Caveolin-1 (TANG W und HEMLER ME 2004). Des Weiteren wurden CD147-CD147-Interaktionen beschrieben (SUN J und HEMLER ME 2001). Diese Interaktionen mit anderen Proteinen beschreiben den Umfang des Auftretens von CD147 und sind entscheidend für dessen vielfältige Funktionen.

2.2.2.1. Integration von MCTs (Monocarboxylat-Transporter)

MCTs sind Proteine, die in die Zellmembran integriert sind. Bisher wurden 14 Isoformen nachgewiesen, wobei die funktionellen Eigenschaften von MCT1 bis 4 bestimmt werden konnten. MCTs spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase und des pH-Wertes innerhalb der Zelle. Sie transportieren protonenabhängig Monocarboxylate, wie Laktat, Pyruvat sowie Ketonkörper, wie Acetoacetat und Hydroxybutyrat durch die Zellmembran (POOLE RC und HALESTRAP AP 1993).

MCTs besitzen 12 transmembranale Domänen mit einem großen Loop zwischen der sechsten und siebten Domäne. Die Amino- sowie Carboxyreste befinden sich intrazellulär (HALESTRAP AP und MEREDITH D 2004).

CD147 befindet sich auf der Zellmembran oft direkt neben einem MCT. Daher wurde zunächst vermutet, dass es auch am Laktattransport durch MCTs beteiligt ist. Dabei wird die Verbindung zwischen MCTs und CD147 vermutlich durch die cytoplasmatische oder transmembranale Domäne ermöglicht, wobei besonders der transmembranale Glutamatrest auf Interaktionen untersucht wurde (KIRK P et al. 2000). Inzwischen ist bekannt, dass CD147 notwendig für die ordnungsgemäße Zelloberflächenexpression und Funktion von MCT1 und MCT4 ist (HALESTRAP AP und MEREDITH D 2004). Um MCTs in die Zellmembran zu integrieren, bindet ein CD147-Dimer zwei Monomere des MCT (WILSON MC et al. 2002).

In Tumoren ist die erhöhte Expression von MCTs verbunden mit einem verstärkten Vorkommen von CD147. Durch die ungehemmte Vermehrung wachsen Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen, weshalb die Energiebereitstellung durch Glykolyse erfolgt. Es wird vermehrt Laktat produziert, so dass ein rascher Abtransport dringend notwendig ist, um das Überleben der Tumorzellen zu sichern (FROBERG MK et al. 2001). Inzwischen dient der Grad der MCT-Expression als Indikator für die Malignität des Tumors.

Die Funktionscharakteristika der MCT-Familie wurden zuerst an MCT1 beschrieben.

MCT1 kann zum einen ein Monocarboxylat zusammen mit einem Proton transportieren oder zum anderen den Austausch eines Monocarboxylates mit einem weiteren regeln.

Mittels einer Konformationsänderung wird das Substrat durch die Membran transportiert. Dort wird das Substrat freigesetzt und die leere Substratbindungsstelle kehrt zur äußeren Oberfläche zurück. Hierbei ist der letzte Schritt beim Netto-Laktattransport durch die Membran geschwindigkeitsbestimmend (DEUTICKE B 1982). Die Stimulation des Laktattransports erfolgt durch den steigenden Konzentrationsgradienten von Protonen und Laktat zwischen Intra- und Extrazellulärraum (HALESTRAP AP und PRICE NT 1999).

MCTs werden in unterschiedlichem Ausmaß in den Geweben von Mensch und Säugetieren exprimiert. Während MCT1 ubiquitär in fast allen Geweben vorkommt, ist MCT2 restriktiver verteilt. MCT3 ist auf der Basalmembran des Pigmentepithels der Retina aufzufinden. MCT4 kommt vor allem in Skelettmuskel und weißen Blutzellen vor (HALESTRAP AP und PRICE NT 1999).

2.2.2.2. Produktion von MMPs (Matrix Metalloproteinasen)

Die Extrazelluläre Matrix (ECM) spielt nach einem Myokardinfarkt eine wichtige Rolle beim Heilungsprozess, der aus Entzündungs-, Granulations- und Remodelingphase besteht.

Die ECM ist verantwortlich für die architektonische Zusammensetzung des Herzens. Sie bildet ein Strukturgerüst aus Typ I- und Typ III-Kollagen, welches die Kardiomyozyten in das Netzwerk integriert. Weitere Bestandteile der ECM sind Proteoglykane, Glukosaminoglykane und Fibronectin. Durch Einbau in die ECM erhalten die Kardiomyozyten ihre korrekte Orientierung, so dass die Pumpfunktion des Herzens durch Koordination der Myozytenkontraktion unterstützt wird (BORG TK und CAULFIELD JB 1981).

Nach einem Myokardinfarkt kommt es zum Abbau der ECM, was langfristig zur Wandverdünnung, Ventrikeldilatation oder sogar Ruptur des Ventrikels führen kann.

Vermutlich wird der Abbau der ECM durch endogene Proteasen verursacht. Bei Ratten wurde nach Myokardinfarkt ein erhöhter Kollagenabbau festgestellt, der in Verbindung mit erhöhter Proteinaseaktivität zu stehen schien (TAKAHASHI S, BARRY C, FACTOR SM 1990). Tatsächlich sind nach Myokardinfarkt aktivierte MMPs in der Lage das Kollagennetzwerk der ECM abzubauen. Damit haben Entzündungszellen die Möglichkeit einzuwandern und nekrotische Kardiomyozyten zu phagozytieren (FRANGOGIANNIS NG et al. 2002). Zudem ermöglichen einwandernde Entzündungszellen die weitere Freisetzung von MMPs (LINDSEY M et al. 2001).

Bei Myokardinfarktversuchen mit MMP-2 und MMP-9 Knockout-Mäusen wurde festgestellt, dass diese beiden Proteasen wesentlich zum Remodeling beitragen. Zum einen konnte die Anzahl der Ventrikeldrupturen nach permanenter Ligatur der LAD verringert werden. Zum anderen wanderten nach Myokardinfarkt weniger Entzündungszellen ein. Des Weiteren zeigte sich ein verringerter Kollagenabbau sowie eine beschleunigte Angiogenese (DUCHARME A et al. 2000; HAYASHIDANI S 2003; LINDSEY ML 2005).

Aktive MMP-9 tritt 24 Stunden nach Myokardinfarkt auf, erreicht nach vier Tagen einen Peak und verringert sich dann allmählich. Sie wird vor allem von einwandernden Neutrophilen und Makrophagen sezerniert (LINDSEY M et al. 2001; TAO Z et al. 2003). MMP-2 wird von Makrophagen, Fibroblasten und Myozyten freigesetzt. Das Maximum an aktiver MMP-2 wird sieben Tage nach Myokardinfarkt erreicht (TAO Z et al. 2003).

MMPs bilden eine Gruppe, die mehr als 25 verschiedene Zink-abhängige Proteasen beinhaltet. Diese sind einerseits an wichtigen physiologischen Prozessen, wie Knochenentwicklung (ORTEGA N et al. 2003; ORTEGA N et al. 2004), Wundheilung (STEFFENSEN B et al. 2001), ovarieller Zyklus (GOLDMAN S und SHALEV E 2003) und Reproduktion (NARDO LG et al. 2003) beteiligt. Andererseits haben MMPs einen Anteil an pathologischen Vorgängen, wie Tumorwachstum, Entzündung und Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

MMPs werden im Myokard von Kardiomyozyten, Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Makrophagen exprimiert. Sie können abhängig von Struktur und Spezifität in fünf Klassen eingeteilt werden: Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine und Membrangebundene (MT-) MMPs (VISSE R und NAGASE H 1992).

Die erstgenannten vier Klassen werden als inaktive Zymogene gebildet und als sogenannte Pro-MMPs in den extrazellulären Raum sezerniert, wo sie spezifisch an Proteine der ECM binden. Sie können bis zu dem Zeitpunkt keine enzymatische Aktivität ausbilden, an dem die Propeptid-Domäne abgespalten wird. Ursache für dieses latente Stadium ist die - durch die Propeptid und Cystein-Zink-Bindung verdeckte - enzymatisch wirksame Domäne. Durch Abspaltung des Propeptids, auch als Cystein-Switch bezeichnet, wird die Zink-Bindungsstelle des enzymatisch aktiven Anteils freigelegt (NAGASE H et al. 2006). Die Abspaltung der Propeptid-Domäne kann durch Plasmin, MT-MMPs, Serin-Proteasen, Trypsin, Chymotrypsin bzw. andere aktive MMPs erfolgen (SPERTI G et al. 1992; NAGASE H und WOESSNER JF 1999; NAGASE H et al. 2005).

Anders als die sezernierten MMPs sind MT-MMPs aktiv, sobald sie in die Zellmembran integriert sind. Die Propeptid-Domäne wird nicht abgespalten, sondern dient zur Aktivierung von sezernierten MMPs und zur Bindung von „tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMPs) (CAO J et al. 1998).

TIMPs sind endogene gewebeigene Hemmer von MMPs, die einen exzessiven Abbau der ECM durch MMPs verhindern. Sie blockieren den Zugang zu den spezifischen Anteilen der ECM, indem sie im Verhältnis 1:1 an die aktivierte Domäne der MMPs binden (BREW K et al. 2000).

Nach einem Myokardinfarkt kommt es zum selektiven Abfall der TIMP-Aktivität verbunden mit einem Anstieg der MMP-9-Aktivität (LI YY et al. 1998; BRADHAM WS et al. 2002). Aus der ausgeglichenen Balance zwischen MMPs und TIMPs entsteht eine Tendenz zu erhöhter proteolytischer Einwirkung und verstärktem ECM-Abbau. Dieses myokardiale Remodeling fördert neben einer möglichen Ruptur die Dilatation des linken Ventrikels und führt zu Funktionseinschränkungen des Herzens (TAO ZY et al. 2004).

Die MMP-Transkription kann durch eine Vielzahl physiologischer Signale, wie Zytokine, matrizelluläre Faktoren, Wachstumsfaktoren oder CD147 modifiziert werden (RIES C und PETRIDES PE 1995; LI YY et al. 2000).

Die Stimulation der MMP-Produktion in Fibroblasten ist eine besondere Fähigkeit von CD147 (LI R et al. 2001; Kataoka H et al. 1993).

Tumorzellen exprimieren CD147 in einem höheren Ausmaß als normale Zellen. Es hat den Anschein, dass CD147 durch Stimulation der MMP-Produktion von benachbarten Fibroblasten das Tumorwachstum fördert (BISWAS C et al. 1995). Dabei scheint CD147 die MMP-Produktion zu induzieren, indem es an ein weiteres CD147 in der Zellwand der Zielzelle bindet (SUN J und HEMLER ME 2001). Die intrazelluläre Signalkaskade erfolgt über die „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK) (LAI WC et al. 2003; YANG Y et al. 2008).

Eine basale CD147-Expression ist im Myokard vorhanden, wobei es sich auf dem Sarkolemm der Kardiomyozyten befindet (Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe). Nach Myokardinfarkt erhöht sich die CD147-Expression (SCHMIDT R et al. 2006; SPINALE FG et al. 2000). Dabei korreliert der Anstieg der CD147-Expression auf Monozyten mit der Erhöhung der MMP-9-Aktivität im Plasma sowie der MT1-MMP-Aktivität (SCHMIDT R et al. 2006). Vermutlich wird die MMP-Expression über CD147-CD147-Interaktionen induziert (SPINALE FG et al. 2000; SCHMIDT R et al. 2006). Zudem ist bekannt, dass eine persistierende Überexpression von CD147 im Myokard vermehrt aktive MMPs hervorruft, die Fibrose und verstärkte Remodelingvorgänge induzieren (ZAVADZKAS JA et al. 2008).

2.2.2.3. Signalrezeptor für extrazelluläres Cyclophilin A

Es wird vermutet, dass die Cyclophiline A und B (CypA und -B) an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind, da ihre Werte in untersuchtem Serum bei einer Sepsis bzw. untersuchter Synovia bei rheumatoider Arthritis oft mit der Schwere der entsprechenden Krankheit korrelieren (BILLICH A et al. 1997; TEGEDER I et al. 1997).

CypA ist ein ubiquitär vorkommendes Immunophilin mit einem Molekulargewicht von 18kDa.

CypA besitzt eine cis-trans-Isomerase-Aktivität, die zur Proteinfaltung dient.

Es befindet sich intrazellulär, kann aber als Antwort auf bestimmte Entzündungsstimuli freigesetzt werden. Im Extrazellulärraum wirkt es chemotaktisch gegenüber neutrophilen und

eosinophilen Granulozyten. Dabei fördert CypA nicht nur die Einwanderung dieser Zellen sondern auch die Degranulation von Eosinophilen. Dieser Prozess führt zur Freisetzung spezifischer Proteine, wie Peroxidasen im geschädigten Areal. Da CypA ubiquitär vorhanden ist, sind verschiedene Gewebe in der Lage, auf Schäden oder Entzündungsreize zu reagieren, indem CypA freigesetzt wird, welches die Migration von Leukozyten fördert.

Durch Bindung an das Immunsuppressivum Cyclosporin kann die chemotaktische Aktivität von CypA gehemmt werden (XU Q et al. 1992; GALAT A 1993; JIN ZG et al. 2000).

Voraussetzung für die chemotaktische Aktivität von Cyclophilinen ist ein Rezeptor auf den Zielzellen. Bereits 2001 konnte CD147 in Verbindung mit Heparansulfatproteoglykan (HSPG) als Zielrezeptor für Cyclophilin B identifiziert werden, wodurch Chemotaxis gegenüber neutrophilen Granulozyten und T-Lymphozyten ausgeübt wird (YURCHENKO V et al. 2001; DE CEUNINCK F et al. 2003).

CypA wirkt ebenfalls über CD147-HSPG-Interaktionen. Aufgrund der ähnlichen Struktur von CypA und B kann CD147 für beide als Rezeptor in Frage kommen.

Anscheinend dienen die HSPGs als primäre Bindungsstellen für CypA und B und stimulieren die Interaktion zwischen Cyclophilin und CD147. Dabei ist die Rotamase-Aktivität von CypA entscheidend für die Wechselwirkung mit CD147. (YURCHENKO V et al. 2002).

Es existiert eine Hypothese über die Art und Weise der Interaktion zwischen CD147, HSPG und CypA: CD147 wird mittels Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert. Intrazelluläres Cyclophilin 60 kann –im Gegensatz zu CypA- ins Golgi-Lumen eindringen. Dort reagiert es mit Prolin 211, einem Anteil von CD147 zwischen transmembranärer und extrazellulärer Domäne. Cyclophiline sind also beteiligt an der Zelloberflächenintegration von CD147. Extrazelluläres CypA reagiert über HSPGs mit Prolin 180 der extrazellulären Domäne von CD147 (siehe Abb.2) (YURCHENKO V et al. 2002; YURCHENKO V et al. 2005; PUSHKARSKY T et al. 2005).

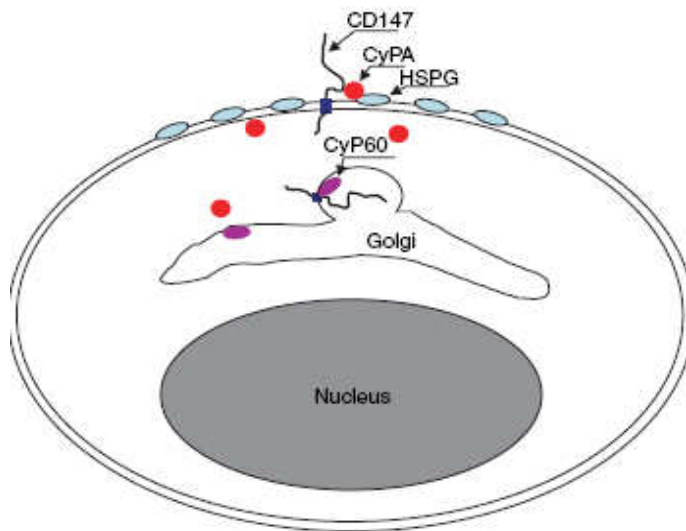


Abb.2: Interaktionen zwischen CD147, HSPG und CypA

CypA - Cyclophilin A; HSPG – Heparansulfatproteoglykan; Cyp60 – Cyclophilin 60
(aus Yurchenko V et al. 2005)

Es wird vermutet, dass die Interaktion von CypA und CD147 über Aktivierung des MAPK-Signalwegs zu vermehrtem Zellwachstum (LI M et al. 2006, YANG F et al. 2008), verstärkter MMP-Produktion (YANG Y et al. 2008; SATOH K et al. 2009) und Aktivierung und Chemotaxis der Zellen (YANG F et al. 2008; SATOH K et al. 2009) führen kann.

2.2.3. CD147-Knockout-Mäuse

Wie bereits erwähnt, ist CD147 an einer Vielzahl physiologischer Vorgänge, wie Reproduktion oder auch Entwicklung des Immun- und Nervensystems beteiligt. Zudem wird CD147 in einer Vielzahl der Gewebe exprimiert (NAKAI M et al. 2006; Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe). Somit müsste eine CD147-Defizienz erhebliche Konsequenzen für die Funktion bestimmter Organsysteme bedeuten.

Die offizielle Bezeichnung der CD147-Knockout-Mäuse lautet $Bsg^{-/-}$ (Basigin-Knockout-Maus). Diese Mäuse werden im Folgenden als $CD147^{-/-}$ bezeichnet, um in der vorliegenden Arbeit eine einheitliche Formulierung zu gewährleisten.

Die Charakterisierung von CD147-Knockout-Mäusen ($CD147^{-/-}$) zeigt, welche vielfältige Rolle CD147 in der Entwicklung und Physiologie eines Lebewesens spielt (siehe Abb.3).

Eine entscheidende Bedeutung hat CD147 in der frühen Embryogenese. In CD147^{-/-} Mäusen konnte mittels verschiedener Proteinbestimmungsmethoden keinerlei CD147-Expression in Hoden- und Uterusgewebe nachgewiesen werden. Dagegen ist im entsprechenden Wildtyp eine deutliche Expression von CD147 in Leydig- und Sertolizellen sowie Nebenhoden erkennbar (IGAKURA T et al. 1998; SAXENA DK et al. 2002; NAKAI M et al. 2006).

CD147^{-/-} Mäuse sind außerordentlich schwierig zu züchten, da ein Großteil der CD147^{-/-} Embryos noch vor Implantation abstirbt. Bei einem heterozygoten Elternpaar (CD147^{+/-} x CD147^{+/-}) beträgt der Anteil der CD147^{-/-} Blastozysten ein Viertel der gesamten Blastozystenanzahl. Dies entspricht der Mendelschen Spaltungsregel, wonach aus heterozygoten Eltern die Merkmale genotypisch im Verhältnis 1:2:1 aufgespalten werden, wobei 50% homozygote und 50% heterozygote Individuen entstehen. Die CD147^{-/-} Blastozysten weisen keine morphologischen Veränderungen auf und entwickeln sich bis zur Implantation völlig normal. Jedoch stirbt ein Großteil der Blastozysten in dem Zeitraum der Implantation ab Tag 4,5 ab. Somit stellt die Implantation ein kritisches Stadium dar. Einmal implantierte CD147^{-/-} Embryos haben danach eine völlig unauffällige embryonale Entwicklung.

CD147 scheint an diesem Vorgang insofern beteiligt zu sein, als dass genau im Implantationszeitraum vermehrt CD147-mRNA auf den interagierenden Geweben Trophektoderm und uterines Endometrium nachgewiesen werden kann. Der Funktionsmechanismus von CD147 in diesem Prozess konnte bisher noch nicht detailliert geklärt werden (IGAKURA T et al. 1998).

Geborene CD147^{-/-} Mäuse haben ein geringeres Körpergewicht als ihre Wurfgeschwister, sind lebensschwach und anfällig für Infektionen, insbesondere für Pneumonien (IGAKURA T et al. 1998).

Weibliche CD147^{-/-} Mäuse zeigen einen unauffälligen Sexualzyklus, physiologisches Fortpflanzungsverhalten und eine ungestörte Ovulation (Kuno et al. 1998).

Obwohl die Hoden von CD147^{-/-} Mäusen morphologisch unauffällig erscheinen, sind männliche CD147^{-/-} Mäuse infertil. Es sind keine Anomalitäten im Hormonhaushalt festzustellen. Jedoch ist die Anzahl der Spermatozoen in den Hoden stark verringert, während primäre Spermatozyten reichlich vorhanden sind. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich die Keimzellen zunächst normal entwickeln und ihre Differenzierung in der Metaphase der ersten Meiose stoppt (IGAKURA T et al. 1998). In diesem Stadium der Entwicklung werden die Keimzellen zum größten Teil nekrotisch und in einzelnen Fällen apoptotisch. Nach ihrer Degeneration akkumulieren sie in den Lumen der Tubuli seminiferi. Zudem benötigen CD147^{-/-} Mäuse für jede Entwicklungsstufe der Keimzellen mehr Zeit als CD147^{+/-} Mäuse. Da der Androgenhaushalt in CD147^{-/-} Mäusen unauffällig ist, wirkt sich die CD147-Defizienz sowohl auf die Entwicklungsgeschwindigkeit als auch auf die Differenzierung von Spermatozyten aus (TOYAMA Y et al. 1999).

Aufgrund des immunhistochemischen Nachweises von CD147 an Teilen der Blut-Hirn-Schranke kann eine Beteiligung von CD147 an deren Funktion nicht ausgeschlossen werden. Allerdings konnte kein signifikanter Defekt in der Blut-Hirn-Schranke von CD147^{-/-} Mäusen entdeckt werden (IGAKURA T et al. 1996).

CD147^{-/-} Mäuse zeigen insofern Verhaltensauffälligkeiten, als dass sie Defizite im Lernen sowie in der Gedächtnisleistung aufweisen und weniger sensitiv auf irritierende Reize

reagieren (IGAKURA T et al. 1996). Diese Abnormitäten könnten mit dem CD147-Knockout in Verbindung stehen, da CD147 stark im Limbischen System, Hippocampus, Hypothalamus, Amygdala, Thalamus und weiteren Arealen des ZNS exprimiert wird (FAN QW et al. 1998). Neben diesen neurologischen Auffälligkeiten sind auch Abnormitäten des visuellen Verhaltens erkennbar. CD147^{-/-} Mäuse benötigen einen längeren Zeitraum, bevor sie einen dunklen Raum betreten (NARUHASHI K et al. 1997).

Mit elektrophysiologischen Tests gelang es HORI et al nachzuweisen, dass diese Mäuse schon nach wenigen Wochen ihr Sehvermögen verlieren (HORI K et al. 2000). Ursächlich dafür könnte die CD147-Defizienz in der Retina sein, da CD147 in Wildtypmäusen auf Müller-Zellen, Retinaepithel, retinalem Kapillarendothel und auf den inneren Segmenten der Photorezeptorzellen stark exprimiert wird (PHILP NJ et al. 2002; OCHRIETOR JD et al. 2001). Auch die Retina junger CD147^{-/-} Mäuse erscheint zunächst morphologisch unauffällig. Allerdings degenerieren die Photorezeptorzellen mit zunehmendem Alter und sind nach 43 Wochen nahezu verschwunden (HORI K et al. 2000). Die frühen Auffälligkeiten der CD147^{-/-} Mäuse in elektrophysiologischen Tests - obwohl das Retinaepithel zu diesen Zeitpunkten noch morphologisch unauffällig erscheint - lassen darauf schließen, dass schon im Alter von wenigen Wochen Veränderungen im Ionenhaushalt eine Rolle beim Verlust des Sehvermögens spielen.

MCTs, die für die Ein- und Ausfuhr von Monocarboxylaten wie Laktat verantwortlich sind, benötigen CD147 für ihre Zelloberflächenexpression. In CD147^{-/-} Mäusen ist die Expression von MCT1 und 3 im retinalen Epithel und MCT4 im neuralen Epithel vermindert. Somit kann der Laktattransport in der Retina nicht durchgeführt werden. Ein physiologischer Austausch von Laktat zwischen Photorezeptorzellen und Müller-Zellen ist jedoch erforderlich, um die retinale Funktion aufrecht zu erhalten. Müller-Zellen nutzen die Glykolyse zur Energiegewinnung, wodurch sich Laktat anhäuft. Dieses wird durch MCTs zu benachbarten Photorezeptorzellen transportiert, die Laktat zur oxidativen Phosphorylierung benötigen. Durch eine CD147-Defizienz können die MCTs nicht mehr an die Zelloberfläche befördert werden. Dadurch gerät die metabolische Homöostase zwischen Müller- und Photorezeptorzellen aus dem Gleichgewicht und die Photorezeptorzellen degenerieren. (PHILP NJ et al. 2002).

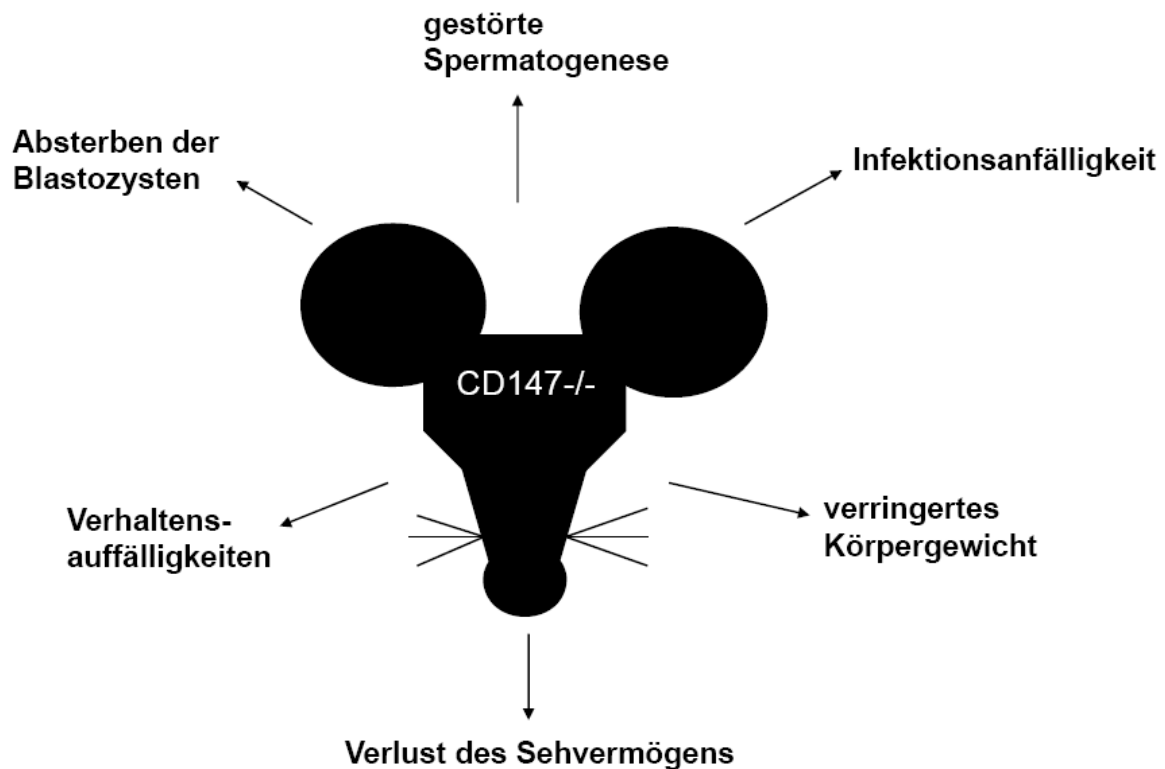


Abb. 3: Abnormitäten der CD147^{-/-}Maus

2.2.4. CD147 in verschiedenen Krankheitsprozessen

2.2.4.1. CD147 in Tumorgeweben

CD147 wurde erstmals vor über 20 Jahren auf der Oberfläche von Tumorzellen entdeckt. Da es die Produktion von MMPs in benachbarten Fibroblasten induziert, bekam es die Bezeichnung „tumor cell-derived collagenase stimulatory factor“ TCSF (BISWAS C et al. 1987).

Inzwischen gibt es zahlreiche Studien, die darlegen, dass die Malignität des Tumors mit dem Grad der CD147-Expression auf den Tumorzellen in Verbindung steht (DAVIDSON B et al. 2003; ROSENTHAL EL et al. 2003; JIN JS et al. 2006; ZHENG HC et al. 2006; TSAI WC et al. 2007). Dabei scheint das Ausmaß des CD147-Vorkommens unabhängig von Alter und Geschlecht des Patienten sowie etwaiger Metastasenbildung zu sein, sondern mit Größe des Tumors und klinischem Stadium des Patienten zu korrelieren (HUANG Z et al. 2009). Zudem besteht ein positiver Zusammenhang zwischen CD147-Expression und dem Vorkommen von MMP2, MMP9 und VEGF auf Tumoren (TANG Y et al. 2005; ZHENG HC et al. 2006). Darüber hinaus gelang es experimentell vielfach durch Gabe von CD147-Antikörpern, das

Tumorstadium sowie Angiogenese und Metastasenbildung zu minimieren (TANG Y 2005; DEAN NR 2009; VOIGT H 2009).

Es wird vermutet, dass die Induktion der MMP-Produktion über die Signaltransduktionswege der MAP-Kinasen ERK $\frac{1}{2}$ und p38 abläuft. MAP-Kinasen (MAP, engl. mitogen-activated protein) werden durch Phosphorylierung aktiviert und gelangen in den Zellkern, wo sie Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und somit die Transkription bestimmter Zielgene regulieren. In ovariellen Karzinomen ist ein Zusammenhang zwischen Expression und Aktivität von MMPs und MAP-Kinasen erkennbar. MMP1-, MMP2- und MMP9-Expressionen korrelierten mit der CD147-Expression sowie der ERK-Aktivität (DAVIDSON B et al. 2003). In Lungentumorzellen ist ein Zusammenhang zwischen CD147-abhängiger MMP1-Produktion und p38-Aktivität nachweisbar (LIM M et al. 1998).

Eine deutliche CD147-Überexpression in verschiedenen Tumorzellen wurde in zahlreichen Studien nachgewiesen (JIN JS et al. 2006; ROSENTHAL EL et al. 2003). CD147 fördert die MMP-Produktion durch benachbarte Fibroblasten. Dieses geschieht vermutlich durch CD147-CD147-Interaktionen. Die MMPs sorgen für einen verstärkten Abbau der Extrazellulären Matrix, so dass das Tumorstadium ungehindert fortschreiten und Metastasen sich besser einnisten können (KATAOKA H et al. 1993; BISWAS C et al. 1995; SUN J et al. 2001).

TANG vermutet, dass CD147 über einen positiven Feedback-Mechanismus die eigene Produktion in Tumorzellen anregt (siehe Abb.4). Diese Theorie konnte er *in vitro* auch bestätigen. Demnach stimuliert CD147 zunächst über eine direkte CD147-Interaktion die MMP-Produktion auf benachbarten Fibroblasten. Durch proteolytische Aktivität der MMPs wird das transmembranär lokalisierte CD147 in eine lösliche Form umgewandelt, indem der intrazelluläre Carboxylterminus abgespalten wird. Das lösliche CD147 regt sowohl die MMP- als auch die CD147-Produktion in Fibroblasten an. Durch die Löslichkeit des Proteins ist die Stimulation nicht nur in direkter Tumorumgebung sondern auch von dieser entfernt möglich. Somit wird das Tumorstadium zusätzlich gefördert (TANG Y 2004).

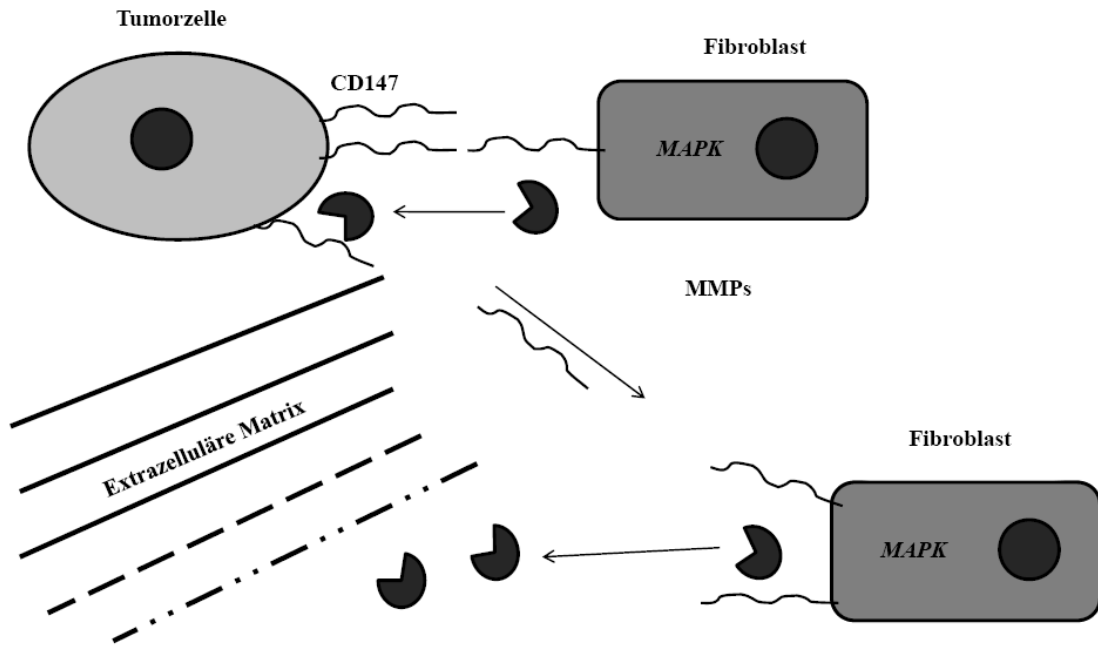


Abb.4: Auf Tumorzellen exprimiertes CD147 regt über einen positiven Feedback-Mechanismus die eigene Bildung an.

Zunächst wird über eine CD147-CD147-Bindung die MMP-Produktion in benachbarten Fibroblasten induziert. Dieses erfolgt vermutlich über den Signaltransduktionsweg der MAPK. Sezernierte MMPs spalten den Carboxylterminus von CD147 ab, wodurch dieses in eine lösliche Form umgewandelt wird. Aufgrund dessen ist sowohl die Anregung der MMP-, als auch der CD147-Bildung in weiter entfernten Gebieten möglich. Die verstärkte Freisetzung von MMPs sorgt für einen vermehrten Abbau Extrazellulärer Matrix, wodurch weiteres Tumorwachstum ermöglicht wird.

MAPK – mitogen-activated protein kinase; MMP – matrix metalloproteinase
(modifiziert nach TANG Y et al. 2005)

Weiterhin konnten in humanen Brustkrebszellen Korrelationen zwischen der CD147-Expression und der Produktion von „vascular endothel growth factor“, VEGF, festgestellt werden. Dabei induziert eine CD147-Überexpression auch eine vermehrte Transkription von VEGF-mRNA. Die Expression von VEGF wird vermutlich durch einen MMP-abhängigen Signalweg vollzogen und inhibiert, sobald CD147-Aktivität oder MMPs gehemmt werden. Diese Ergebnisse sind auch *in vivo* anhand beschleunigten Tumorwachstums und –angiogenese sichtbar (TANG Y et al. 2005). Zuletzt konnte dagegen in einem Melanom-Modell durch CD147 beschleunigte MMP-unabhängige Angiogenese und Metastasenbildung nachgewiesen werden (VOIGT H et al. 2009).

Des Weiteren konnte in Pankreastumorzellen eine erhöhte Expression von CD147 und CypA festgestellt werden. Wird zusätzlich exogenes CypA dazugegeben, wird die Proliferation der Tumorzellen abhängig von der Menge des zugegebenen CypA stimuliert. Vermutlich ist der Signalweg CD147-abhängig, da dieses Resultat ausbleibt, wenn CD147 durch einen Antikörper gehemmt wird (LI M et al. 2005).

CD147 und MCTs sind an der Tumorzelloberfläche zumeist nebeneinander lokalisiert, wobei die Expression von MCT abhängig ist von CD147 (KIRK P et al. 2000; PINHEIRO C et al. 2009). In Tumorzellgewebe wird infolge schnellerer Proliferation ein erhöhter Zellstoffwechsel benötigt. Zudem wird die Umgebung des Tumors zunehmend hypoxisch. Durch vermehrt einsetzende Glykolyse zur Energiebereitstellung, steigt die intrazelluläre Laktatkonzentration an. Daneben wird durch die Hypoxie der „hypoxia inducible factor“ HIF-1 α hochreguliert, der zu einer erhöhten Transkription von MCTs führt. Zudem wird die Produktion von VEGF angeregt, welches die Angiogenese induziert (MOELLER LC et al. 2005; SEMENZA G 2000). Die MCTs transportieren Laktat in den Extrazellulärraum rund um die Tumorzellen. Das extrazelluläre Laktat inhibiert die zytotoxische T-Zellfunktion, so dass der Tumor ungehemmt weiter wachsen kann (siehe Abb.5) (FISCHER K et al. 2007).

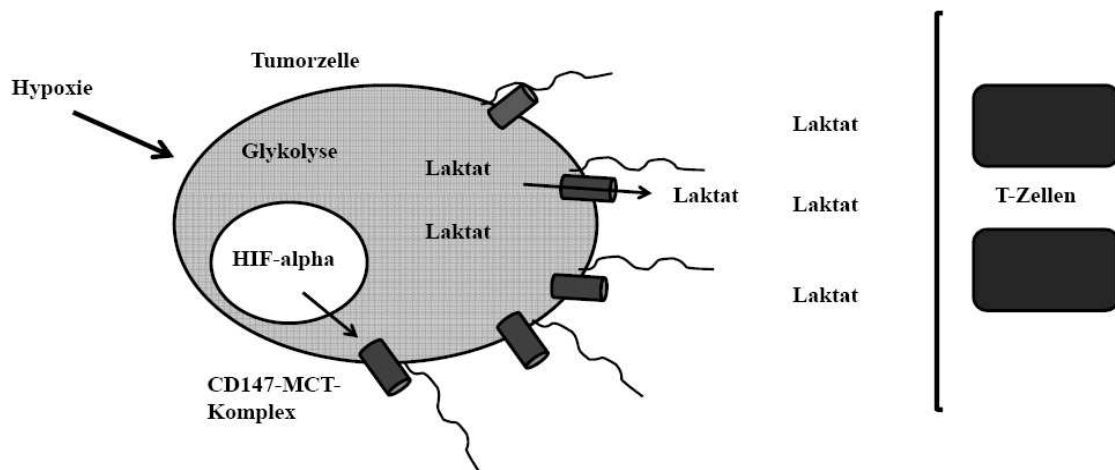


Abb.5: Die CD147-abhängige MCT-Expression auf der Zellmembran ermöglicht den Abtransport intrazellulären Laktats.

Durch hypoxische Zustände betreiben Tumorzellen vermehrt Glykolyse, was in einer erhöhten intrazellulären Laktatansammlung resultiert. Zudem induziert die Hypoxie HIF-1 α , welcher die Transkription von MCTs und damit auch die Ausschleusung von Laktat aus der Zelle anregt. Die Ansammlung extrazellulären Laktats wehrt zytotoxische T-Zellen ab.

HIF α – hypoxia inducible factor α ; MCT – Monocarboxylat-Transporter
(modifiziert nach IANOCO KT et al. 2007)

2.2.4.2. CD147 bei ischämischen Zuständen

Ischämische Zustände sind durch eine Hypoxie gekennzeichnet, die im Herzen bei einem Myokardinfarkt bzw. im Gehirn beim Schlaganfall entsteht. Durch den länger andauernden Sauerstoffmangel müssen die Zellen Glykolyse betreiben, um ihren Energiebedarf zu decken. Die Konsequenz ist eine intrazelluläre Ansammlung von Laktat, welches mittels CD147-abhängiger MCTs aus den Zellen transportiert werden muss (KIRK P 2000). Unter hypoxischen Bedingungen sind CD147- und MCT-Expressionen im Gehirn vermehrt (ZHANG F et al. 2005).

Zudem dient CD147 als Signalrezeptor für extrazelluläres CypA (YURCHENKO V et al. 2001). Durch eine Überexpression von CypA können neuronale Zellkulturen vor oxidativen Schäden geschützt werden. Bisher konnte dieser CypA-abhängige neuroprotektive Mechanismus noch nicht charakterisiert werden (BOULOS S et al. 2007). Auch im Herzen wird CypA nach Hypoxie von den Myozyten sezerniert. Dies konnten SEKO et al. *in vitro* nachweisen (SEKO Y et al. 2004). In der eigenen Arbeitsgruppe konnte ebenfalls extrazelluläres CypA im murinen Myokard nach Myokardinfarkt immunhistochemisch dargestellt werden.

Des Weiteren wird CD147-abhängig die Produktion von MMPs nach Myokardinfarkt induziert (SCHMIDT R et al. 2006). Insbesondere MMP2 und 9 führen nach Myokardinfarkt zum Abbau der Extrazellulären Matrix und somit zum verstärkten Remodeling. Diese Wirkung konnte anhand zahlreicher Studien mit MMP2- oder MMP9-defizienten Mäusen bestätigt werden. Diese Knockout-Mäuse zeigen nach Myokardinfarkt geringere Remodelingvorgänge, eine verringerte Anzahl einwandernder Entzündungszellen sowie teilweise geringere Infarktgrößen und schnellere Angiogenese (DUCHARME A et al. 2000; ROMANIC AM et al. 2002; MATSUMURA S et al. 2005; LINDSEY ML et al. 2006). Auch nach zerebraler Ischämie ist ein Zusammenhang zwischen CD147- und MMP-Aktivität sowie Remodelingprozessen in Cortex und Basalganglien erkennbar. Der Grad der CD147-Expression korreliert mit der MMP9-Aktivität nach fokaler zerebraler Ischämie. MMP9 fördert den Abbau der Extrazellulären Matrix, was zu einer Impermeabilität der Blut-Hirn-Schranke und folglich zu Ödemen und Hämorrhagien führen kann (FUJIMURA M et al. 1999; ROSENBERG GA et al. 2001; BURGGRAF D et al. 2005; ZHU W et al. 2008).

Bei renaler Ischämie und Reperfusion sorgt ein CD147-Knockout für eine verringerte Einwanderung neutrophiler Granulozyten und zu geringer ausgeprägten Nierenschädigungen. KATO et al. konnten zeigen, dass CD147 auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten als Ligand für E-Selektin dient und somit die Einwanderung dieser Zellen in das Entzündungsgebiet induziert. Folglich führt die Defizienz von CD147 in CD147^{-/-}-Mäusen zu einer verminderten Migration der Entzündungszellen (KATO N et al. 2009).

2.2.4.3. CD147 bei Morbus Alzheimer

Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung, die mit Verhaltensauffälligkeiten und Abnahme der kognitiven Leistungsfähigkeit einhergeht. Pathognomonisch für diese Erkrankung sind aus Beta-Amyloid (A β)-Peptiden gebildete Plaques und Neurofibrillen, die sich im Gehirn der Patienten ansammeln. Das Vorläuferprotein des A β -Peptids ist ein transmembranales Protein, welches von bestimmten Enzymen, so genannten Sekretasen gespalten werden kann.

CD147 wurde als regulatorischer Bestandteil des γ -Sekretasen-Komplexes identifiziert. Bei diesem Vorgang wird das Vorläuferprotein zunächst von der β -Sekretase und danach von der γ -Sekretase in der Transmembrandomäne gespalten, was zur Freisetzung des A β -Peptids führt. Während eine CD147-Überexpression keine relevanten Auswirkungen auf die Entstehung des A β -Peptids hat, führt eine Defizienz von CD147 zu einer Steigerung der A β -Peptid-Produktion. Dabei bleiben die jeweiligen Expressionen der anderen γ -Sekretase-Anteile unverändert. Somit reguliert CD147 durch einen bisher noch nicht geklärten Mechanismus die Produktion von A β -Peptiden und kann eine verstärkte Ausbildung von Amyloid-Plaques verhindern (ZHOU S et al. 2004).

In einem Alzheimer-Mausmodell, in dem eine Überexpression des Vorläuferproteins vom A β -Peptid stattfindet, können ähnliche Verhaltensauffälligkeiten festgestellt werden wie in CD147^{-/-} Mäusen. Es fallen deutliche Defizite in der Gedächtnisleistung und im räumlichen Denken auf. Dabei gehen die Verhaltensabnormitäten der Entstehung von Amyloidplaques zeitlich voraus, jedoch konnten Zusammenhänge zwischen pathologischen Veränderungen und Defiziten in der neurophysiologischen Leistungsfähigkeit festgestellt werden. Dabei scheint selbst lösliches A β -Peptid nachteilige Einflüsse auf das neuronale System zu haben, bevor sichtbare pathologische Erscheinungen in Form von Amyloid-Plaques auftreten (RICHARDSON JC et al. 2003).

2.3. Zum Immunophilin Cyclophilin A

2.3.1. Allgemeines

Cyclophilin A (CypA) ist ein ubiquitär vorkommendes Immunophilin mit einem Molekulargewicht von 18kDa.

Es wurde aufgrund seiner starken Affinität zu dem Immunsuppressivum Cyclosporin A bekannt (HANDSCHUMACHER RE et al. 1984). Cyclophilin A und Cyclosporin bilden einen Komplex, der durch Inhibierung von Calcineurin die T-Zellfunktion und Induktion von Zytokinen blockiert (LIU J et al. 1992).

CypA befindet sich intrazellulär, kann aber infolge inflammatorischer Stimuli in den extrazellulären Raum sezerniert werden (JIN ZG et al. 2000). Dort dient es als Chemoattraktant gegenüber Monozyten, T-Zellen sowie neutrophilen und eosinophilen Granulozyten (JIN ZG et al. 2000; SHERRY B et al. 1992; XU Q et al. 1992).

Weitere Studien legen dar, dass CypA eine herausragende Rolle im Verlauf vaskulärer Erkrankungen, insbesondere bei der Atherosklerose spielt. Demnach aktiviert sezerniertes CypA ERK1/2 („extracellular signal-regulated kinase“), welche über eine erhöhte DNA-Synthese die Proliferation glatter Muskelzellen fördert und vor Zellapoptose schützt (JIN ZG 2000).

In zahlreichen *in vivo* Modellen konnte gezeigt werden, dass die Migration von Entzündungszellen in Inflamationsgebiete sowie Remodelingvorgänge nach lokaler Ischämie durch CypA gefördert werden (SATO K et al. 2009; SATO K et al. 2008; ZHU C et al. 2007; JIN ZG et al. 2000). Zudem konnten bei Patienten mit Sepsis oder rheumatoider Arthritis erhöhte Werte von CypA im Blutplasma festgestellt werden (BILLICH A et al. 1997; TEGEDER I et al. 1997). Diese genannten Publikationen stützen die Hypothese, dass Cyp A an der Pathogenese verschiedener inflammatorischer Erkrankungen beteiligt ist.

2.3.2. CypA-Knockout-Mäuse

Die offizielle Bezeichnung für diesen Mausstamm lautet 129.Cg-Ppia^{tm1Lubn}/J. Daneben werden homozygot defiziente CypA-Mäuse (CypA^{-/-}) auch als Ppia^{-/-} bezeichnet, da ihnen Ppia, das Gen welches Cyclophilin A encodiert, fehlt.

Der genetische Hintergrund dieses Mausstammes basiert auf einer Kombination von MF1 sowie 129S6/SvEv.

CypA^{-/-}-Mäuse sind lebensfähig und zeigen keine Verhaltensauffälligkeiten. COLGAN et al. schließen daraus, dass CypA für Säugetiere nicht essentiell ist (COLGAN J et al. 2004). Homozygot defiziente Mäuse haben eine eingeschränkte Reproduktionsfähigkeit. Die Wurfgröße bei diesen Elterntieren ist um ein Viertel reduziert.

Ein Drittel der CypA^{-/-}-Mäuse entwickeln im Alter von drei Monaten spontan eine Blepharitis, die histologisch durch Infiltrate von mononukleären Zellen, Mastzellen und eosinophilen Granulozyten gekennzeichnet ist. Die Blepharitis kann mit Infiltraten von eosinophilen Granulozyten in Pankreas, Leber und Herz vergesellschaftet sein (COLGAN J et al. 2004).

Zudem ist bei CypA^{-/-}-Mäusen ein verstärktes Auftreten von Splenomegalien zu beobachten (COLGAN J et al. 2004).

Die homozygot defizienten Mäuse besitzen neben einer unauffälligen T-Zell-Entwicklung eine erhöhte Anzahl CD4 und CD8 positiver T-Zellen. Zudem konnten erhöhte Serumlevel der Immunglobuline IgG1 sowie IgE festgestellt werden (COLGAN J et al. 2004).

Nach Behandlung mit Cyclosporin A in physiologisch relevanten Dosen konnte bei CypA^{-/-}-Mäusen keine Immunsuppression festgestellt werden (COLGAN J et al. 2005).

2.4. Zur Eignung der Maus für das Versuchsmodell Myokardinfarkt

Für Myokardinfarktversuche wurden lange Zeit vorrangig Hunde genutzt. Aus Kostengründen und infolge gesellschaftlichen Drucks wurden Hunde durch Schweine ersetzt. Diese sind jedoch schwierig im Handling. Zudem ist das Verhältnis Herzgröße zu Körpergewicht nur dann mit dem des Menschen vergleichbar, wenn die Schweine ein Körpergewicht von 25-30 Kilogramm aufweisen. Neben Schweinen werden auch kleinere Säugetiere, wie Ratten und Kaninchen für Myokardinfarkte genutzt. Letztere wurden mit dem Einsetzen der Entwicklung transgener Mäuse von diesen in vielen Fällen als Versuchstier abgelöst. Das Mausgenom ist ausführlich charakterisiert und kann leicht manipuliert werden. Weitere Vorteile von Mäusen als Versuchstiere sind geringer Platzanspruch, kurze Tragezeiten, Größe der Würfe, leichtes Handling sowie geringer Kostenaufwand für Haltung und Ernährung der Tiere (WEBB S et al. 1996; VERDOUW PD et al. 1998; TARNAVSKI O et al. 2003).

Dabei ist die wichtigste Voraussetzung, dass kardiovaskuläre Zustände von der Maus auf den Menschen übertragbar sind. Hierbei müssen Möglichkeiten und Grenzen der Mausmodelle erkannt werden, um wissenschaftliche Ergebnisse richtig interpretieren zu können.

Anatomisch besitzen die Herzen von Mensch und Maus im Aufbau der Ventrikel viele Gemeinsamkeiten. Differenzen sind beim Austritt der Pulmonarvene vorhanden: bei der Maus existiert nur ein einzelner Austritt (WEBB S et al. 1996).

Der Verlauf der Koronararterien ist bei Mensch und Maus sehr ähnlich. Allerdings konnte bei der C57Bl/6J Maus ein einzelnes Koronargefäß aufgezeigt werden, welches das Septum versorgt. Es geht entweder direkt von der rechten Sinusklappe aus oder ist ein Ast der rechten Koronararterie (KUMAR D et al. 2005).

Ein weiterer Unterschied zwischen dem Herzen des Menschen und dem der Maus ist im Erregungsleitungssystem aufzufinden: Der Sinusknoten der Maus befindet sich an der Vena cava superior, beim Menschen dagegen in der Vorderwandverdickung des rechten Herzhohls (LEV M und THAEMERT J 1973).

Des Weiteren variiert das Herzgewicht zwischen den einzelnen Mauslinien. Dabei existiert ein Herz-Körpergewicht-Verhältnis von 5 bis 6mg/g Körpergewicht bei der Maus und 5g/kg Körpergewicht beim Menschen (GOTTSHALL KR et al. 1977).

Herzen kleinerer Säugetiere haben höhere energetische Anforderungen. Das spiegelt auch der Mitochondriengehalt im Myokard wieder. Dieser beträgt 38% bei der Maus und 25% beim Menschen (BARTH E et al. 1992).

Die Erzeugung von Myokardinfarkten in der Maus durch Ligatur einer Koronararterie wurde erstmals vor 30 Jahren beschrieben (ZOLOTAREVA AG und KOGAN ME 1978).

Aufgrund des Verlaufs der Koronararterien bei der Maus entstehen bei Okklusion der LAD antero-apikal transmurale Infarkte. Es kann eine Dilatation des linken Ventrikels und die Verdünnung der betroffenen Wand folgen. Infolge des Verlaufes der Septalarterie ist das Septum meist vom Infarkt nicht betroffen. Es ergibt sich daraus folgend ein anderes Infarktgebiet als beim Menschen, wodurch auch Veränderungen im Remodelingprozess entstehen könnten (MICHAEL LH et al. 1995; KUMAR D et al. 2005).

Die Ligation der LAD (left anterior descending artery) direkt kaudal des Herzohres ist das am häufigsten durchgeführte Myokardinfarktmodell. Kleinere Infarkte entstehen, wenn ausschließlich die Äste der LAD ligiert werden (AHN D et al. 2004). Zudem existieren Myokardinfarktmodelle, bei denen die Ischämie durch Kryotechnik erzeugt wird. Trotz unterschiedlicher Pathophysiologie entstehen dabei Infarkte, die bei verringerter Mortalität zu ähnlichen Kontraktilitäts- und Funktionseinschränkungen führen (van den BOS EJ et al. 2005). Darüber hinaus kann durch sonographische Untersuchungen die ventrikuläre Funktionseinschränkung nach Myokardinfarkt quantifiziert werden (GARDIN JM et al. 1995).

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. ZIELVORSTELLUNGEN

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss des CD147-CypA-Systems auf das Ausmaß des myokardialen Schadens nach Ischämie und Reperfusion. Die Ischämie und die darauf folgende Reperfusion werden dabei chirurgisch durch Okklusion eines Koronargefäßes der Maus hervorgerufen.

Es ist bekannt, dass CD147 sowohl inflammatorische als auch proteolytische Prozesse fördert (SCHMIDT R. et al, 2006; YURCHENKO V. et al, 2001). Des Weiteren ist Cyclophilin A an der Pathogenese inflammatorischer Prozesse beteiligt (SATO H K et al. 2008; ZHU C et al. 2007; JIN ZG et al. 2004). Der Autor vermutet, dass das CD147-CypA-System das Ausmaß geschädigten Herzgewebes nach myokardialer Ischämie/Reperfusion maßgeblich beeinflusst. Diese Studie basiert auf der Hypothese, dass eine Reduktion von CD147 oder CypA zu einer weniger ausgeprägten Inflammation und damit verbunden zu kleineren Infarktarealen nach Ischämie und Reperfusion führt. Die Reduktion von CD147 wird hierbei zum einen in Form einer heterozygot defizienten Maus für CD147 und zum anderen pharmakologisch durch monoklonale Antikörper erreicht. Die Beteiligung von CypA am myokardialen Remodeling wird anhand einer homozygot CypA-defizienten Maus (CypA^{-/-}) untersucht. Während es bereits mehrere vorausgegangene Untersuchungen über die Auswirkung des CD147-Antikörpers sowie der CypA-Defizienz bei inflammatorischen Prozessen gibt (DAMSKER J.M. et al, 2009; ZHU C. et al, 2007; DEAR J.W. et al, 2007; GWINN W.M. et al, 2006; ZHU P et al. 2005), sind die Effekte einer Inflammation bei der heterozygoten Basiginmaus (CD147^{+/-}) bisher völlig unbekannt.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, werden zunächst Wildtypmäuse (CD147^{+/+}) und CD147-defiziente, heterozygote (CD147^{+/-}) Mäuse dem unter Punkt 3.2.4. beschriebenen Infarktmodell unterzogen. Die entstehenden Infarktgrößen sollen Aufschluss darüber geben, inwieweit die CD147-Heterozygose Einfluss auf den Grad der Inflammation nach Ischämie und Reperfusion hat.

Vergleichend dazu werden C57Bl/6J-Mäuse mehrmals vor und nach chirurgischem Eingriff mit antiCD147-Antikörper behandelt. Die Vergleichsgruppe erhält die Isotypkontrolle. Hierbei wird der Einfluss des pharmakologischen CD147-Knockouts auf die Infarktgröße sowie Funktionseinschränkung der Herzen nach myokardialer Ischämie und Reperfusion untersucht.

Experimente an CypA-defizienten Mäusen (CypA^{-/-}) sollen darlegen, ob inflammatorische Prozesse nach myokardialer Ischämie/Reperfusion durch einen CypA-Knockout positiv beeinflusst werden.

3.2. MATERIAL UND METHODEN

3.2.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere dienen 29 heterozygote (CD147^{+/-}) Basiginmäuse und Wildtypkontrollen aus der Kolonie (CD147^{+/+}) mit einem Gewicht von ca. 25g, die auf dem genetischen Hintergrund der C57Bl/6J-Linie beruhen. Die homozygot defizienten Basiginmäuse (CD147^{-/-}) sind schwierig zu züchten, da bei der Embryogenese die Implantation gestört ist. Zudem sind die wenigen lebend geborenen CD147^{-/-} lebensschwach, anfällig für Erkrankungen sowie blind und zeigen Verhaltensauffälligkeiten. Aufgrund dieser Charakteristika sind CD147^{-/-} Mäuse ungeeignet für das Modell der myokardialen Ischämie/Reperfusion an der Maus. Stattdessen werden heterozygot defiziente (CD147^{+/-}) Basiginmäuse, die aus der Eigenzucht der Arbeitsgruppe stammen, genutzt.

Des Weiteren werden 27 C57Bl/6J benötigt. Es handelt sich um ausschließlich männliche Tiere, die ca. 25g wiegen. Sie werden im Alter von fünf bis sieben Wochen aus der Zucht der Charles River GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bestellt.

29 homozygot defiziente Cyclophilin A – Mäuse (CypA^{-/-}) und deren Wildtypkontrollen aus der Kolonie (CypA^{+/+}) stammen aus der Eigenzucht der Arbeitsgruppe. Die Tiere wiegen 20 bis 25g und beruhen auf dem genetischen Hintergrund der MF1 sowie 129S6/SvEv -Linie.

Die Kolonie stammt von heterozygoten Tieren ab, die von The Jackson Laboratory (USA) bezogen und in der Arbeitsgruppe zu homozygot defizienten Tieren gezüchtet wurden.

Die Tiere werden in einer Gruppengröße von bis zu fünf Tieren in Makrolonkäfigen Typ II long gehalten. In den Ställen herrscht ein künstlicher Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden. Die Temperatur beträgt 20 bis 23°C, die relative Luftfeuchtigkeit liegt zwischen 50 und 60%. Eine konstante Be- und Entlüftung zur Erhaltung des Stallklimas ist vorhanden. Die Beleuchtung der Käfige in den Lichtphasen beträgt 50 Lux. Futter (Fa. Provimi Kliba, Kaiseraugst, Schweiz) und Wasser steht den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Bei der Einstreu handelt es sich um entkeimtes und entstaubtes Weichholzgranulat aus Espenholz (Fa. ABEDD – LAB & VET Service GmbH, Wien, Österreich). Der Wechsel der Einstreu erfolgt einmal wöchentlich. In jedem Käfig wird zudem ein Stück sterilisierter Zellstoff gelegt, der den Tieren zum Nestbau und als Beschäftigung dient.

Die Genehmigung der tierexperimentellen Studie erfolgte durch das Regierungspräsidium Tübingen mit der Genehmigungsnummer M7/09.

3.2.2. Genotypisierung

Da homozygot defiziente CD147-Knockout-Mäuse zum einen sehr selten und zum anderen steril sind, erfolgt die Zucht mit heterozygoten Tieren. Dies macht eine Genotypisierung der Tiere nötig.

Zudem konnten CypA-Knockout-Mäuse aufgrund eingeschränkter Fruchtbarkeit der homozygoten Tiere nur als heterozygot defiziente Mäuse bestellt werden. Somit sind bei Eigenzucht homozygot defizienter CypA-Mäuse Genotypisierungen der Tiere vonnöten.

Hierfür wird das Gewebe, welches bei der Ohrmarkierung anfällt, herangezogen.

Die DNA-Isolierung erfolgt mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) gemäß Gebrauchsanweisung.

Mithilfe des Thermal Cyclers wird die DNA amplifiziert. Notwendige Materialien hierfür sind thermostabile DNA-Polymerasen, zwei passende Oligonukleotidprimer sowie Puffer und Nukleotide.

Die Primersequenzen lauten für CD147:

- für F₂_basigin_for: TggCCTTCACgCTCTTgAgC
- für F₂_basigin_rev: gCCTCATCTCTAAgATCACT.

Für CypA werden folgende Primersequenzen genutzt:

- 5'- gCA gTT gTg ATT gAT CCA ggT CCg -3'
- 5'- CAC CCT ggA gCA CCA CTg CCC ACC -3'
- 5'- CCT gAT CgA CAA gAC Cgg CTT CC -3'.

Ein Amplifikationszyklus besteht aus den Phasen Denaturierung, Annealing und Elongation.

Die Denaturierung findet bei einer Temperatur von 94°C statt und führt zur Trennung der beiden DNA-Stränge.

Die Temperatur beim Annealing ist abhängig vom zugeführten Primer, liegt aber im Bereich von 55°C. In dieser Phase binden die Primer an die einzelsträngige DNA.

Anschließend findet die Elongation bei 72°C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, statt. Diese spielt eine entscheidende Rolle bei der Verlängerung des Primers und Bildung einer doppelsträngigen DNA. Jeder neusynthetisierte DNA-Strang kann im nächsten Zyklus ebenfalls als Matrize dienen. Somit wird bei jedem Durchlauf die Konzentration der zu vervielfältigen Zielsequenz erhöht.

Um die DNA effektiv zu amplifizieren, wird der beschriebene Zyklus insgesamt 35 Mal wiederholt.

Die amplifizierten DNA-Fragmente werden mithilfe der Gelelektrophorese in einem 1,5%igen Agarose-Gel bei 100V aufgetrennt. Um die entstehenden Banden identifizieren zu können, wird das Gel zehn Minuten in Ethidiumbromid inkubiert. Unter UV-Licht können die Banden sichtbar gemacht werden.

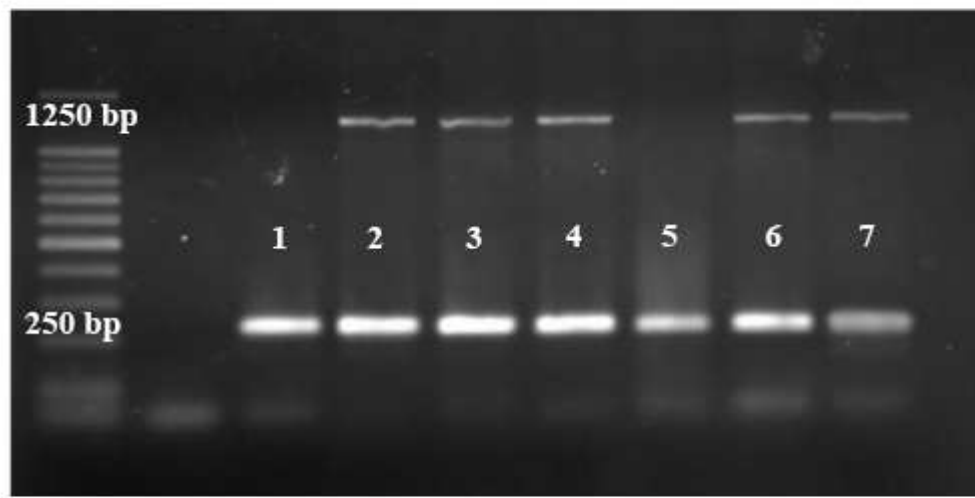


Abb.6: Exemplarische Bandenbildung nach Gelelektrophorese im UV-Licht.

Links ist die DNA-Leiter dargestellt, die an definierten Stellen Banden ausbildet und somit zur Identifizierung dient.

Bei 250 Basenpaaren befindet sich die Bande, die die $CD147^{+/+}$ Mäuse charakterisiert (Maus 1 und 5). Bei $CD147^{+/-}$ Mäusen ist eine zusätzliche Bande bei 1250 Basenpaaren erkennbar (Maus 2, 3, 4, 6 und 7)

3.2.3. Übersicht Versuchsplan

Diese Studie wird in sechs Versuche mit jeweils zwei Gruppen eingeteilt (siehe Tab.1).

Versuchsnummer 1

Im ersten Versuch werden sieben $CD147^{+/-}$ einer myokardialen Ischämie/Reperfusion unterzogen. Als Kontrollgruppe dienen sechs $CD147^{+/+}$. Auch in dieser Gruppe wird operativ eine myokardiale Ischämie sowie Reperfusion erzeugt. Die Euthanasie der Tiere erfolgt 24 Stunden *post operationem*. Die Infarktgröße wird *ex vivo* an den geschnittenen und gefärbten Herzen planimetrisch bestimmt.

Versuchsnummer 2

In sechs $CD147^{+/-}$ wird operativ eine myokardiale Ischämie/Reperfusion erzeugt. Die Kontrollgruppe aus fünf $CD147^{+/+}$ wird ebenfalls diesem chirurgischen Eingriff unterzogen. Sieben Tage nach Operation erfolgt eine sonographische Untersuchung der Herzen. Anschließend werden die Tiere euthanasiert und die Herzen für die Infarktgrößenbestimmung gefärbt und entnommen.

Versuchsnummer 3

Sechs C57Bl/6J werden eine Stunde vor Setzen der Ligatur mit anti-CD147-Antikörper (1µg/g Körpergewicht der Maus) intraperitoneal behandelt. Anschließend werden die Mäuse einer myokardialen Ischämie/Reperfusion unterzogen. Die zweite Injektion von anti-CD147-Antikörper erfolgt in der gleichen Dosierung sechs Stunden nach Operation. 18 Stunden nach Operation erhalten die Mäuse die dritte Injektion. Der Kontrollgruppe von sieben C57Bl/6J wird die Isotypkontrolle (1µg/g Körpergewicht der Maus) zu denselben Zeitpunkten vor und nach chirurgischem Eingriff injiziert. 24 Stunden *post operationem* werden die Mäuse euthanasiert und die Infarktgröße planimetrisch bestimmt.

Versuchsnummer 4

Fünf C57Bl/6J wird eine Stunde vor Setzen der Ligatur anti-CD147-Antikörper in der Dosierung 1µg/g Körpergewicht der Maus intraperitoneal verabreicht und anschließend operativ eine myokardiale Ischämie sowie Reperfusion erzeugt. Weitere Injektionen derselben Dosierung erfolgen sechs und 18 Stunden *post operationem*. Danach wird den Mäusen einmal täglich bis zur Euthanasie anti-CD147-Antikörper in der oben genannten Dosierung injiziert. Die Kontrollgruppe umfasst vier C57Bl/6J und erhält zu denselben Zeitpunkten vor und nach chirurgischem Eingriff die Isotypkontrolle (1µg/g Körpergewicht der Maus). Sieben Tage nach Operation findet die sonographische Untersuchung der Herzen statt. Zur Bestimmung der Infarktgröße werden die Herzen gefärbt, entnommen und die entsprechenden Flächen planimetrisch berechnet.

Der in Versuch 3 und 4 verwendete anti-Maus CD147-Antikörper stammt aus RL73.2 Hybridomzellen (Genovac, Freiburg). IgG2a-Hybridomzellen HB189 (Genovac, Freiburg) der Ratte werden zur Produktion der Isotypkontrolle genutzt.

Versuchsnummer 5

Sechs CypA^{-/-} werden operativ einer myokardialen Ischämie/Reperfusion unterzogen und 24 Stunden später euthanasiert, um die Infarktgröße zu bestimmen. Die Kontrollgruppe besteht aus neun CypA^{+/+} und erfährt dieselbe Behandlung wie die Versuchsgruppe.

Versuchsnummer 6

Fünf CypA^{-/-} erhalten eine myokardiale Ischämie/Reperfusion. Die Kontrollgruppe aus sechs CypA^{+/+} wird ebenfalls diesem Eingriff unterzogen. Sieben Tage *post operationem* findet eine echokardiographische Untersuchung statt. Anschließend werden die Mäuse euthanasiert und die Infarktgröße bestimmt.

Tab.1: Übersicht über die Versuchsdurchführung

AK – Antikörper; Inj. – Injektion; OP - Operation

Versuchsnummer	Beschreibung der benötigten Mäuse	zusätzliche Behandlung	Euthanasie	Untersuchungen
1	sieben CD147 ^{+/-} Kontrolle: sechs CD147 ^{+/+}	keine	24h post OP	Infarktgröße MMP-Aktivität
2	sechs CD147 ^{+/-} Kontrolle: fünf CD147 ^{+/+}	keine	sieben Tage post OP	Infarktgröße Echokardiographie
3	sechs C57Bl/6J Kontrolle: sieben C57Bl/6J	CD147-AK oder Isotyp 1. Inj: 1h prä OP 2. Inj: 6h post OP 3. Inj: 18h post OP	24h post OP	Infarktgröße MMP-Aktivität
4	fünf C57Bl/6J Kontrolle: vier C57Bl/6J	CD147-AK oder Isotyp 1. Inj: 1h prä OP 2. Inj: 6h post OP 3. Inj: 18h post OP täglich eine Inj. bis zur Euthanasie	sieben Tage post OP	Infarktgröße Echokardiographie
5	sechs CypA ^{-/-} Kontrolle: neun CypA ^{+/+}	keine	24h post OP	Infarktgröße
6	fünf CypA ^{-/-} Kontrolle: sechs CypA ^{+/+}	keine	sieben Tage post OP	Infarktgröße Echokardiographie

3.2.4. Operationsdurchführung

3.2.4.1. Vorbereitung der Operation

Zur Anästhesie der Maus dient eine antagonisierbare Kombinationsnarkose aus drei Bestandteilen: dem α_2 -Adrenozeptoragonisten Medetomidin (Domitor®, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) in einer Dosierung von 0,5mg/kg Körpergewicht, dem Benzodiazepin Midazolam (Midazolam® ratiopharm, Ratiopharm Ulm) mit 5mg/kg Körpergewicht und dem Opioid Fentanyl (Curamed pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland) mit 0,05mg/kg Körpergewicht (nach HENKE & ERHARDT 2004). Die Injektion des Narkosemittels erfolgt intraperitoneal.

Nach Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums werden die linke Thoraxseite sowie die ventrale Halsregion mit einem Scherapparat (Wahl®, Clipper Corp, Modell 9962, China) vom Haarkleid befreit. Für die gründlichere Haarentfernung wird auf diese Areale Enthaarungscreme (dm Balea body, Karlsruhe, Deutschland) aufgetragen (siehe Abb.8).

Anschließend erfolgen die Reinigung der Operationsbereiche mit isotoner Kochsalzlösung (NaCl®, Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland) und die Desinfektion mit Povidon-Jod-Lösung (Braunol®, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland).

Zum Schutz vor Austrocknung wird Augensalbe (Bepanthen, Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) auf die Cornea aufgetragen.

Für die Tracheotomie wird die Maus in Rückenlage verbracht (siehe Abb.8). Die Vordergliedmaßen werden seitlich vom Körper abgespreizt und mit Klebeband (Leukofix®, BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland) fixiert. Durch eine unter den Hals geschobene Kanüle (Becton Dickinson, Spanien) wird die Halsregion überstreckt. Dies erleichtert die Durchführung der Tracheotomie.

Bis zur Tracheotomie wird die Maus durch eine selbst angefertigte Atemmaske ausreichend mit Sauerstoff versorgt. Dabei beträgt die Sauerstoffzufuhr 0,8l pro Minute.

Anschließend wird die Rektalsonde eingeführt und mit Klebeband (Leukopor®, BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland) fixiert. Diese Sonde ist über einen Temperaturregler (FHC Bowdoinham, ME 04008, USA) mit einer Wärmematte (FHC Bowdoinham, 5x12,5 cm, USA) gekoppelt. Die Feineinstellung erfolgt manuell, dabei sollte die Körpertemperatur bei $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ gehalten werden.

Sowohl Tracheo- als auch Thorakotomie werden mikrochirurgisch mit zwölfacher Vergrößerung unter einem Stereomikroskop (Zeiss, Deutschland) durchgeführt (siehe Abb.7). Vor Beginn der Operation wird zur Kontrolle einer ausreichenden Narkosetiefe der Zwischenzehenreflex überprüft.

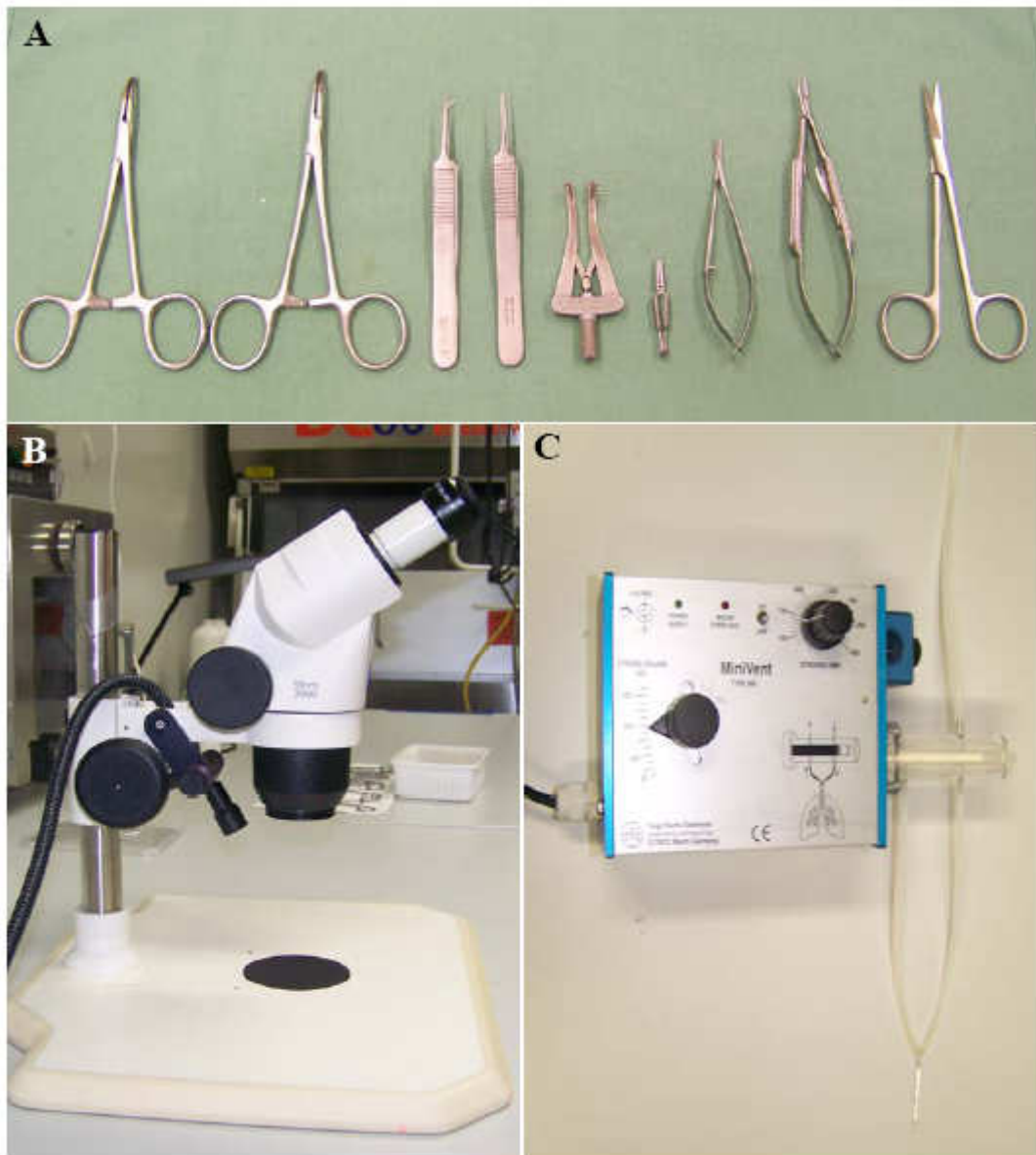


Abb.7: Arbeitsmaterialien

Instrumente (A), Stereomikroskop (B) sowie Beatmungsgerät (C). Diese werden für die chirurgisch herbeigeführte myokardiale Ischämie/Reperfusion benötigt.

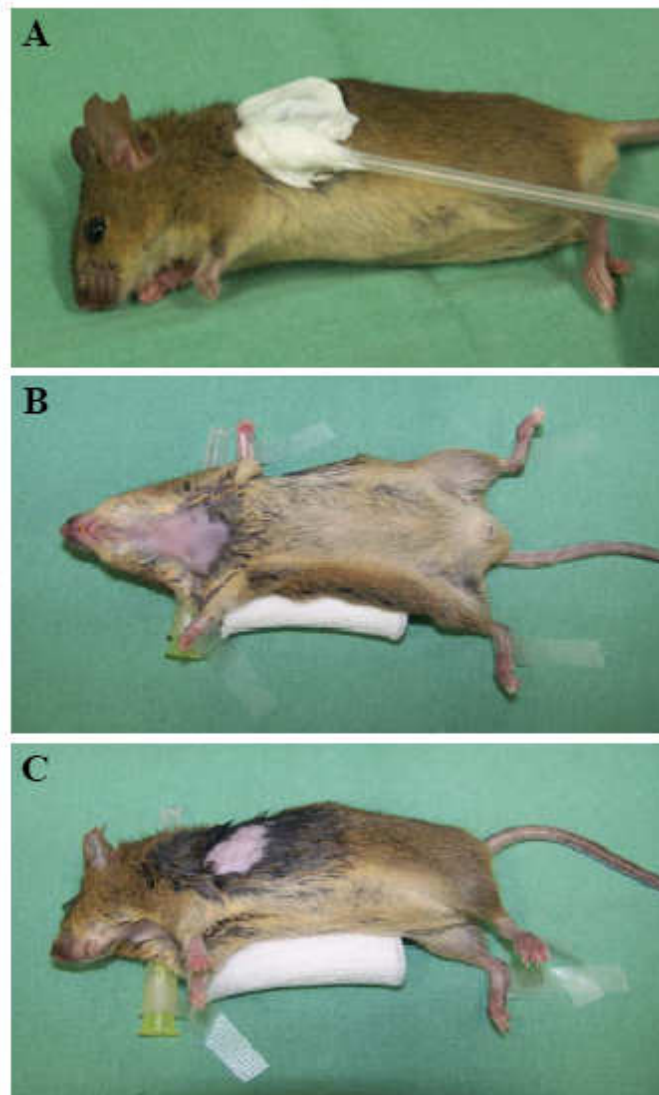


Abb.8: Vorbereitung und Lagerung der Maus.

Sie wird an der ventralen Halsregion sowie an der linken Seite des Thorax enthaart (A). Zur Tracheotomie wird die Maus in Rückenlage (B), für die Thorakotomie in Seitenlage fixiert (C).

3.2.4.2. Tracheotomie

Der Schnitt wird auf der Halsunterseite in der Höhe der Larynx gesetzt. Dabei wird die Haut auf einer Länge von 0,5cm inzidiert. Dies geschieht, indem die Haut mit einer Pinzette angehoben und anschließend mit einer mikrochirurgischen Schere durchtrennt wird. Die

darunter erscheinenden paarigen Anteile der Glandula mandibularis werden stumpf in der Medianen getrennt. Es kommt der paarige Musculus sternohyoideus zum Vorschein. Dessen Muskelbäuche werden mithilfe von Haltefäden (6-0 Prolene, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) gespreizt, so dass die Sicht auf den Kehlkopf und den direkt anschließenden Teil der Trachea frei wird.

Die Inzision der Trachea erfolgt zwischen der zweiten und dritten Trachealspange kaudal des Cartilago cricoidea. Zur Erleichterung der Intubation wird die dritte Trachealspange ebenfalls mit einem Haltefaden (7-0 Prolene, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) fixiert. Der Metalltubus (Außendurchmesser 1,3mm, Länge 3,2 cm, Hugo Sachs, March-Hugstetten) wird vorsichtig in die Trachea eingeführt bis die Verdickung verschwunden ist (siehe Abb.9). Nun erfolgt die Beatmung über eine spezielle Kolbenhubpumpe Minivent (MINIVENT Mouse Ventilator Typ 845, Hugo Sachs, March-Hugstetten) mit einer Frequenz von 120 Atemzügen pro Minute und einem Tidalvolumen von 180µl. Der Sauerstoff-Flow beträgt weiterhin 0,8l/min, als Erhaltungsdosis dient eine Einstellung von 0,7 – 1,5 Volumenprozent Isofluran (Isoflo®, Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland).

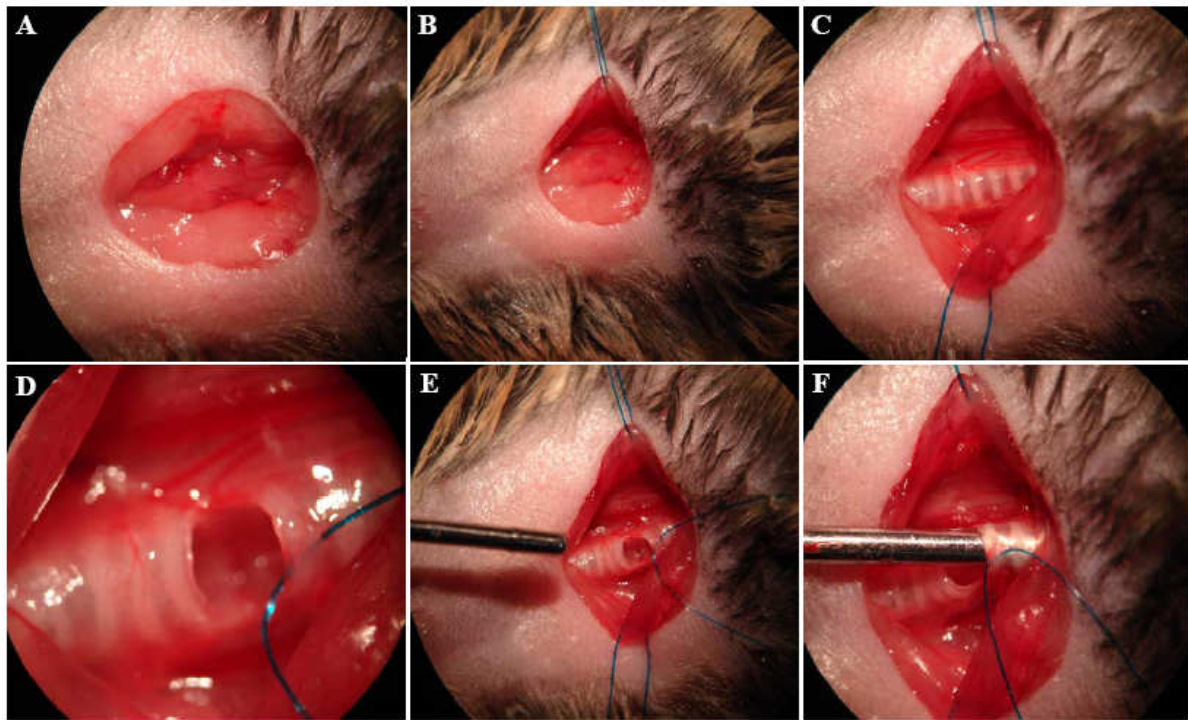


Abb.9: Tracheotomie und Intubation

Im Anschluss an die Inzision der Haut und die stumpfe Trennung des Unterhautgewebes (A) wird der Musculus sternohyoideus durchtrennt und seine paarigen Anteile mittels Haltefäden fixiert. Somit ist die Sicht auf die Trachea möglich (B, C). Diese wird zwischen zwei Trachealspangen inzidiert. Mithilfe eines weiteren Haltefadens an der hinteren Trachealspange (D) kann der Metalltubus eingeführt werden (E, F).

3.2.4.3. Thorakotomie und Ligatur der LAD

Für die Thorakotomie ist es notwendig, die Maus umzulagern. Dazu wird sie vorsichtig in die rechte Seitenlage verbracht (siehe Abb.8). Dabei sollte das Herausrutschen des Trachealtubus vermieden werden. Die Maus wird leicht schräg gelagert, indem ein selbst angefertigter Keil aus Vlies unter das Abdomen geschoben wird. Diese Lagerung erleichtert später das Auffinden des zu ligierenden Gefäßes. Die Gliedmaßen werden wiederum mit Klebeband (Leukofix®, BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland) auf der Unterlage befestigt, wobei die Vorderbeine nach kranial gelagert werden.

An der Stelle der linken Thoraxwand, an der der Herzspitzenstoß am deutlichsten zu sehen ist, wird der Hautschnitt gesetzt. Dieser Bereich entspricht in der Regel dem vierten Interkostalraum. Die Haut wird mit der Pinzette angehoben und mithilfe einer mikrochirurgischen Schere durchtrennt. Anschließend wird der Hautschnitt senkrecht nach dorsal und ventral verlängert.

Der direkt darunter liegende Musculus cutaneus trunci wird stumpf durchtrennt, der Musculus serratus ventralis thoracis entlang seines Faserverlaufs und die Musculi intercostales externi und interni werden vorsichtig zusammen mit der Pleura durchschnitten. Somit ist der Thorax vollständig eröffnet (siehe Abb.10). Kleinere Blutungen werden mittels Saugtupfer (Ethikeil®, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) gestillt. Ein spezieller Rippenspreizer (fine science tools GmbH, Heidelberg, Deutschland) wird in die Wunde eingeführt und aufgeschraubt. Der Griff des Spreizers wird hochgelagert, damit dessen Gewicht nicht vollständig auf dem Brustkorb der Maus lastet. Nun ist die Sicht auf die inneren Organe möglich. Sollte die Lunge den Blick auf das Herz behindern, kann sie mit einem vorher zurechtgeschnittenen Saugtupfer (Ethikeil®, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) beiseite geschoben werden.

Das Perikard wird vorsichtig mit der Pinzette ergriffen und gefensternt, so dass die linke Herzhälfte frei liegt. Dabei sollte der Kontakt mit eingelagertem Fettgewebe vermieden werden, da dort oft Blutgefäße verlaufen.

Die LAD (left anterior descending artery) befindet sich in der Facies auricularis, einer Kuhle unterhalb des linken Herzohres. Aufgrund ihrer hellroten Färbung lässt sich die LAD gut von den dunkleren Herzkranzvenen abgrenzen. Zur besseren Sicht kann das Herzohr mit einem auf 1mm Seitenlänge zugeschnittenem Tupfer (Ethikeil®, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) nach kranial geschoben werden, so dass es sich von der Facies auricularis abhebt. Die LAD wird unterstochen und aus dem Faden (6-0 Perma Hand Seide schwarz, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) wird eine Schlaufe gebildet. Darunter wird ein ca. 2mm langer Polyethylenschlauch (Außendurchmesser 0,61mm, Innendurchmesser 0,28mm, Polyethylene Tubing, SIMS Portex Ltd, SIMS trademarks, UK) gelegt und die Schlaufe festgezogen (siehe Abb.11). Somit kann die Ligatur später durch Entfernen des Polyethylenschlauches leichter gelöst werden. Das erfolgreiche Ligieren des Gefäßes ist daran erkennbar, dass die Arterie distal der Ligatur nicht mehr sichtbar ist. Zudem treten manchmal durch die Ischämie hervorgerufene erhöhte Herzfrequenzen sowie Arrhythmien bis hin zum Kammerflimmern auf.

Die Ligatur wird 30 Minuten liegen gelassen, dabei wird der Wundspreizer geschlossen um innere Organe vor dem Austrocknen zu schützen. Die Wundränder werden mit Ringerlösung

feucht gehalten. Während dieser Zeit sollte die Körpertemperatur der Maus immer wieder kontrolliert und konstant bei $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ gehalten werden. Des Weiteren sollte der Rippenspreizer alle fünf Minuten geöffnet und der Sitz des Fadens sowie des Polyethylenschlauches überprüft werden.

Nach genau 30 Minuten wird der Polyethylenschlauch entfernt und die Schlaufe gelöst. Die Fäden bleiben im Herzgewebe, um nach der Reperfusion die Ligatur an exakt derselben Stelle wieder setzen zu können. Die Reperfusion der Arterie distal der Ligatur sollte nun deutlich erkennbar sein.

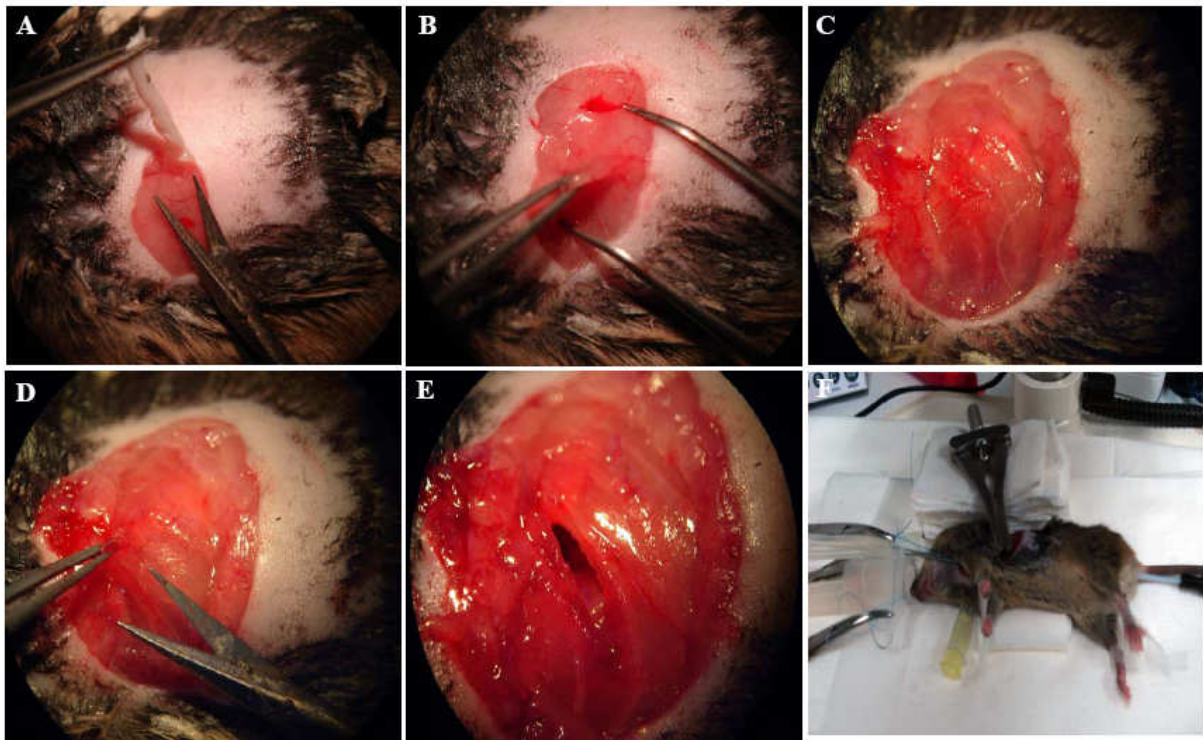


Abb.10: Durchführung der Thorakotomie

Nach der Hautinzision (A) wird das Unterhautgewebe stumpf getrennt (B). Der darunter befindliche Musculus serratus ventralis thoracis (C) wird entlang des Faserverlaufs getrennt. Die Durchtrennung der Musculi intercostales sowie der Pleura erfolgt im dritten Interkostalraum (E). Anschließend wird der Rippenspreizer eingeführt (F).

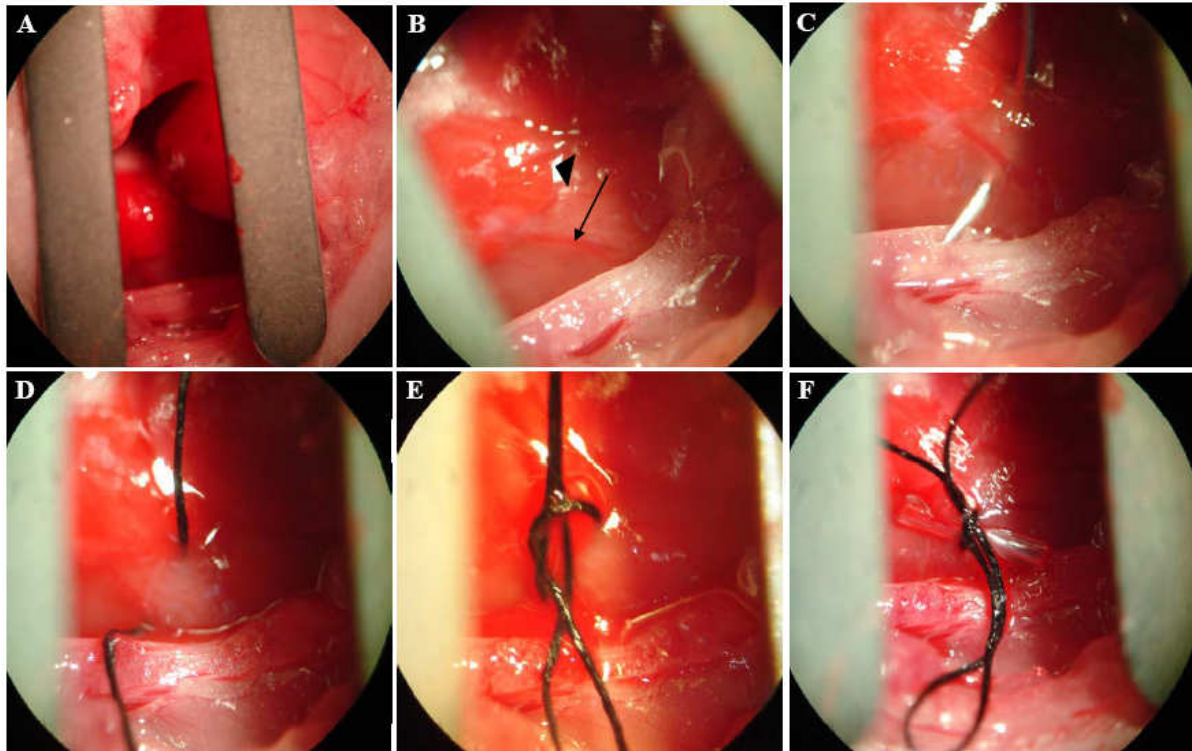


Abb.11: Ligatur der LAD

Aufsicht auf das Herz (A) sowie in der Vergrößerung linkes Herzohr (▲) und LAD (↓). Die LAD wird mit einer Nadel-Faden-Kombination unterstochen (C, D) und aus den Fäden eine Schlaufe gebildet (E). Ein kurzes Stück Polyethylenschlauch wird dazwischen geschoben und die Schlaufe festgezogen (F).

3.2.4.4. Verschluss der Thorakotomie -und Tracheotomiewunde

Nach Entfernen des Rippenspreizers wird die Inzision zwischen den Rippen mit Einzelheften verschlossen. Dazu werden die Fäden (6-0-Vicryl®, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) zunächst um die vierte und fünfte Rippe vorgelegt und anschließend festgezogen. Auf diese Naht werden die Enden des Ligaturfadens gelegt, so dass diese nach dem Reperusionszeitraums leicht aus der Muskeltasche gezogen werden können. Muskelschichten und Faszia werden mit einer fortlaufenden Naht (6-0 Vicryl®, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Die Haut wird mit Einzelheften (6-0 Prolene® blau, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) zugenäht.

Wenige Minuten vor Extubation wird die Isofluranzufuhr allmählich auf 0,5% abgesenkt. Nach Verschluss der Hautinzision wird Isofluran völlig abgesetzt und die Sauerstoffzufuhr erhöht.

Aufgrund der langsamen Anflutung wird Buprenorphin (Temgesic®, ESSEX PHARMA GMBH, München, Deutschland) zur postoperativen Analgesie bereits 30 Minuten vor Ende

der Operation verabreicht. Die Injektion des Arzneimittels erfolgt subkutan in einer Dosierung von 0,1mg/kg Körpergewicht.

Anschließend wird der Metalltubus aus der Trachea entfernt. Setzt die Spontanatmung nicht ein, wird die Maus reintubiert und einige Minuten mit Sauerstoff beatmet. Bei erneuter Extubation sollte die Maus selbständig atmen. Dem Tier wird weiterhin Sauerstoff über die Atemmaske zugeführt.

Der Haltefaden wird aus der dritten Trachealspange entfernt. Die Öffnung zwischen den Knorpelspangen wird mit einem Einzelheft (8-0 Vicryl®, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Nachdem die Haltefäden für den Musculus sternohyoideus gelöst sind, wird die Hautwunde mit zwei bis drei Einzelheften (6-0 Prolene® blau, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) zugenäht (siehe Abb.12).

Die Klebestreifen werden von den Gliedmaßen gelöst und die Maus auf den Bauch gesetzt. Nun erfolgt die Antagonisierung der Narkose mit einer Kombination aus Atipamezol (Antisedan®, Pfizer GmbH, Karlsruhe) mit einer Dosierung von 2,5mg/kg Körpergewicht und Flumazenil (Flumazenil Kabi® 0,1mg/ml, Fresenius Kabi Dtsch GmbH, Bad Homburg, Deutschland) in einer Dosierung von 0,5mg/kg Körpergewicht.

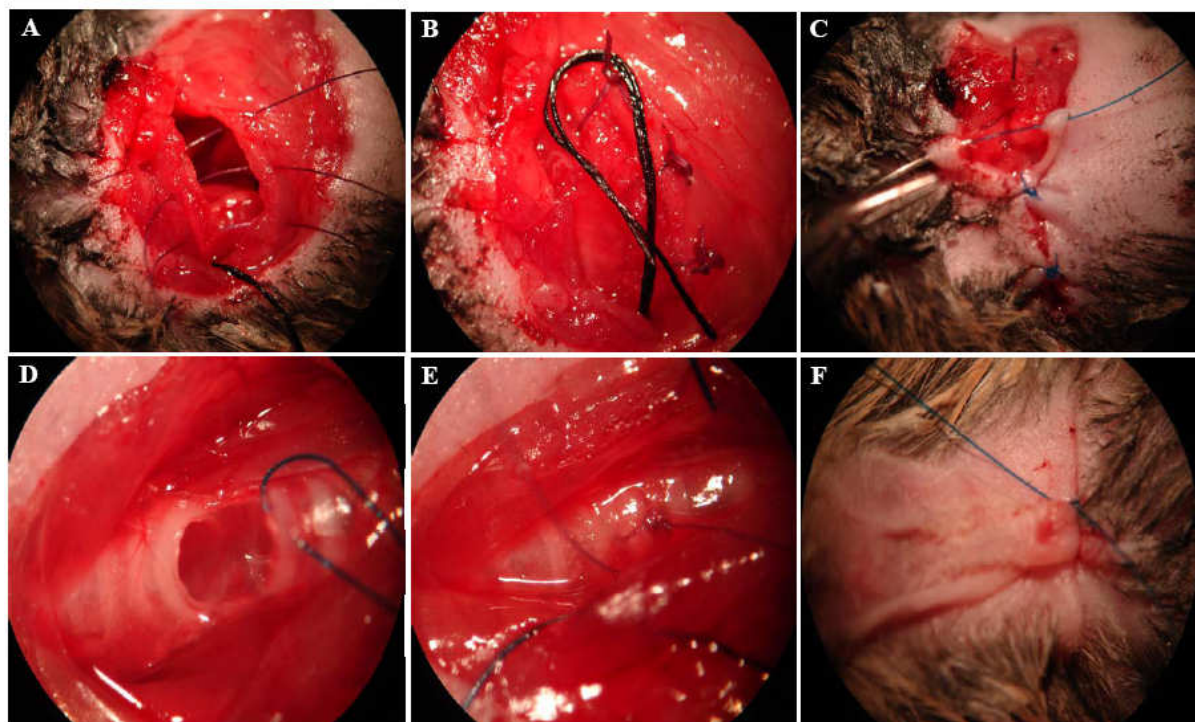


Abb.12: Verschluss der Thorakotomie- (A, B, C) und Tracheotomiewunde (D, E, F)

3.2.4.5. Postoperative Versorgung der Maus

Die Maus verbleibt unter der Atemmaske, bis sie vollständig aus der Narkose erwacht ist. Danach wird sie separat in einen Käfig gesetzt, der zur Hälfte mit einer Rotlichtlampe bestrahlt wird. Dadurch werden die durch die Operation geschwächten Tiere vor Auskühlung geschützt.

In der Reperfusionsphase erhalten die Mäuse Wasser und Futter wie gewohnt *ad libidum*.

Acht Stunden nach Operationsende wird den Mäusen erneut subkutan Buprenorphin (Temgesic®, ESSEX PHARMA, München, Deutschland) in einer Dosierung von 0,1mg/kg Körpergewicht verabreicht.

3.2.4.6. Färbung des Herzens zur Bestimmung der Infarktgröße

Nach gewünschtem Zeitraum erfolgt eine erneute Anästhesie der Maus. Die Anästhesie und Fixierung der Maus erfolgt wie oben beschreiben.

Darauf folgt die Intubation: Die Hautnähte vom Operationstag werden gelöst. Die Präparation erfolgt stumpf zur Trachea vor, wobei der paarige Musculus sternohyoideus wiederum durch Haltefäden gespreizt wird. Das Einzelheft, das am Vortag zum Verschluss der Trachea diente, wird gelöst. Der Metalltubus wird vorsichtig in die Trachea eingeführt.

Nach der Intubation werden die Einstellungen zur Beatmung der Maus verändert: Die Isofluranzufuhr wird auf 2,5 Volumenprozent erhöht, um die Narkose zu vertiefen. Die Atemfrequenz bleibt unverändert bei 120 Atemzügen pro Minute, das Tidalvolumen beträgt 180µl und der Sauerstoffflow 0,8%.

Es wird der unter der Haut deutlich erkennbare Processus xiphoideus aufgesucht. Kaudal davon erfolgt der Hautschnitt senkrecht zur Körperachse von einer Seite zur anderen verlaufend. Anschließend wird das Peritoneum großflächig eröffnet. Auftretende Blutungen werden mit Ethikeil® gestillt. Das Zwerchfell wird perforiert. Der Thorax wird eröffnet, indem Pleura, Muskeln, Rippen und Haut der rechten Seite von kaudal nach kranial jeweils auf Höhe des Corpus costae mit der Schere durchtrennt werden. Nun kann dieser Thoraxanteil nach links geklappt und mit einer Klemme fixiert werden.

Die aus dem Herzen ragenden Seidenfäden, deren Enden am Vortag in einer Muskeltasche vernäht wurden, werden aufgesucht. Sie werden vorsichtig zwischen den Rippen hervor gezogen und die Ligatur wird erneut gesetzt.

Am schlagenden Herzen wird mit einer 1ml-Spritze 0,5ml 0,5%iges Evans Blue (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Deutschland) in den linken Herzventrikel injiziert. Evans Blue ist ein blauer Farbstoff, der jegliches Gewebe anfärbt, welches trotz Ligatur perfundiert wird. Somit stellt der blau angefärbte Anteil des Herzens Gewebe dar, das von der Ischämie nicht betroffen ist. Die gelungene Perfusion der Maus wird an der Blaufärbung der Haut sowie anderer Organe sichtbar (siehe Abb.13).

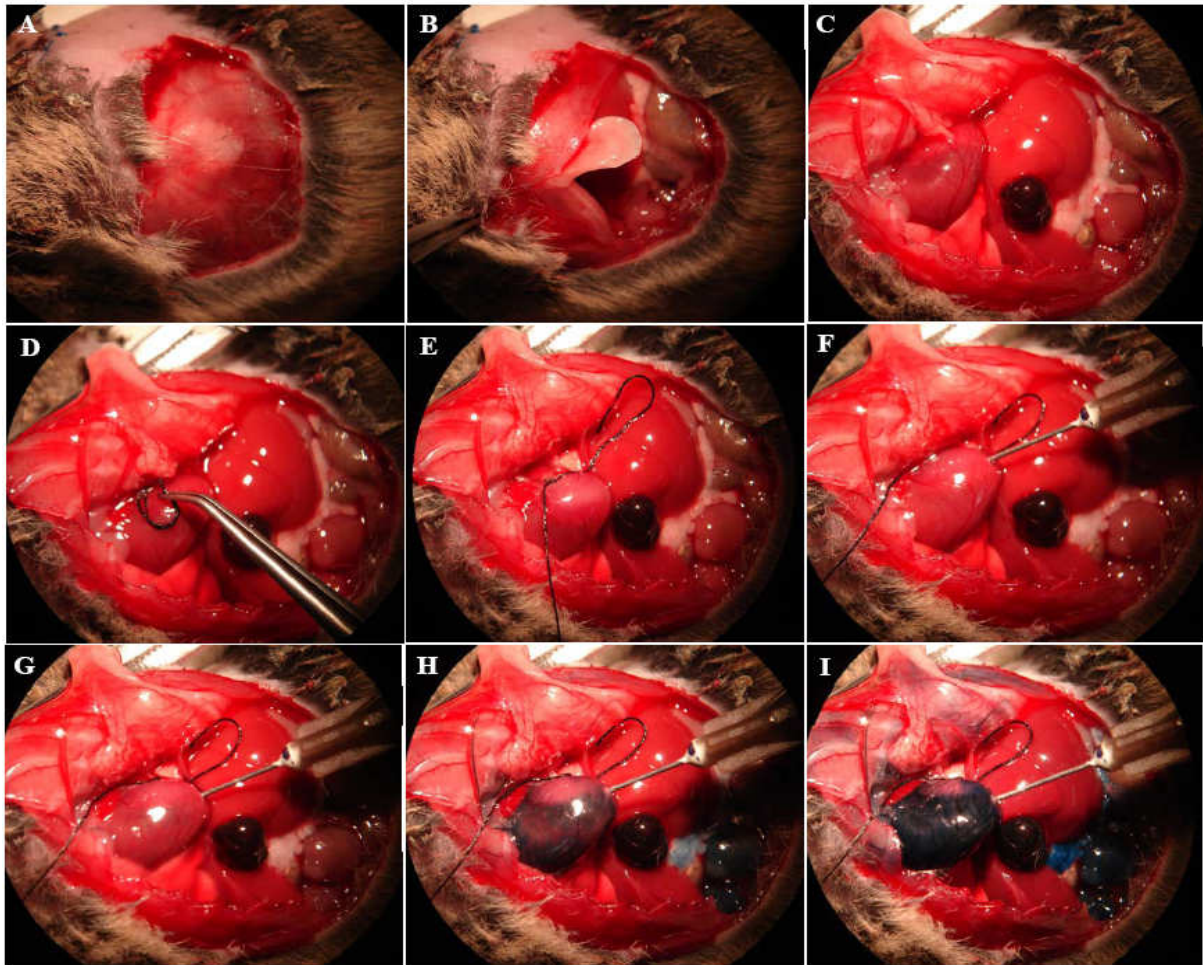


Abb.13: Evans Blue – Färbung

Abdomen (A) und Peritoneum (B) werden auf Höhe des Processus xiphoideus eröffnet (C). Die Fädenenden werden aufgesucht und aus der Muskeltasche gezogen (D).

Durch erneute Ligatur der LAD (E) und intraventrikuläre Injektion von Evans Blue (F, G) wird das gesamte Myokard bis auf die ischämische Region perfundiert (H). Blau angefärbte Kapillaren und Organe deuten auf eine gelungene Perfusion hin (I).

Anschließend wird der Maus sofort mit einer 1ml-Spritze 0,3ml 1M-Lösung Kaliumchlorid in den linken Ventrikel injiziert, um einen Herzstillstand herbeizuführen.

Das Herz wird entnommen und mit NaCl gereinigt. Es wird mit Ethikeil® trocken getupft, mit Tissue Tec® (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwonde, NL) bedeckt und 30 Minuten bei -20°C tiefgefroren. Danach wird das noch gefrorene Herz mit einem Einmalskalpell senkrecht zur Längsachse in fünf einzelne, ca. 1mm dicke Querscheiben zerteilt. Diese werden nochmals mit NaCl gereinigt, um das Tissue Tec® zu entfernen. Sodann werden die Scheiben zehn Minuten unter Lichtabschluss bei 37°C in 1%iger TTC- (2,3,5 Triphenyltetrazolium-Chlorid-)Lösung aufbewahrt. Anschließend erfolgt die Fixierung in

4%igem Formaldehyd (siehe Abb.14).

TTC wird durch oxidative Phosphorylierung mitochondrialer Dehydrogenasen zu dem roten Farbstoff 1,3,5Triphenylformazan umgewandelt. Diese Umwandlung findet nur in vitalem Gewebe statt. Die entstehenden, rot angefärbten Anteile des Herzens stellen den ischämischen Bereich der sogenannten „area at risk“ (AaR) dar. Somit sind die von der Ischämie betroffenen und rot angefärbten Zellen deutlich von dem zugrunde gegangenen, hellen und blass erscheinendem Gewebe des Infarktareals abgrenzbar.

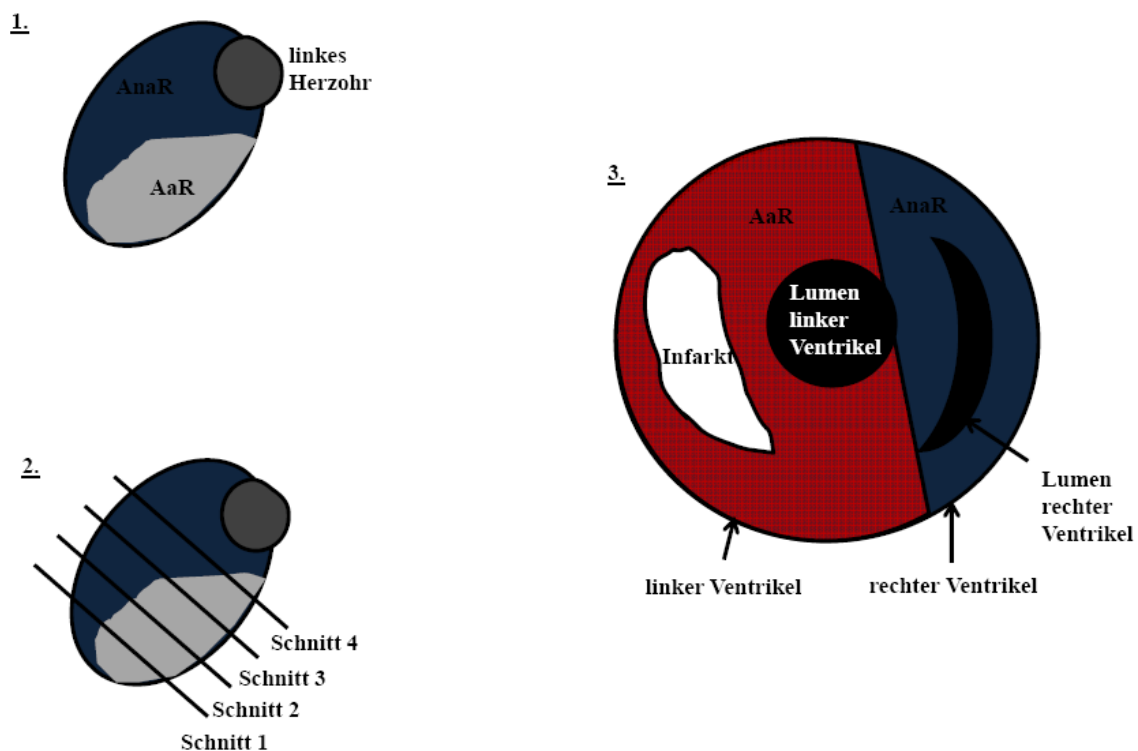


Abb. 14: Exemplarische Darstellung der Aufbereitung und Auswertung von murinen Herzen nach Ischämie/Reperfusion:

1. Nachdem Evans Blue® in den linken Ventrikel injiziert wurde, wird das Herz entnommen. Die ungefärbte „area at risk“ ist deutlich von der blauen „area non at risk“ abgrenzbar.
2. Das in Tissue Tec® gefrorene Herz wird in fünf Querscheiben geteilt. Die vom Apex aus ersten vier Scheiben sind für die Auswertung der Infarktflächen relevant
3. Nach der TTC-Färbung können Infarktgebiet (weiß), Ischämieareal (rot) und „area non at risk“ (blau) bestimmt werden. Zudem können auch Flächen und Lumina von rechtem und linkem Ventrikel planimetrisch ausgemessen werden.

3.2.4.7. Auswertung der Areale

Die ersten vier Herzscheiben, ausgehend von der Apex, werden mit einer elektronischen Waage (BP 210 S, Sartorius AG, Deutschland) gewogen. Anschließend werden diese Querscheiben von beiden Seiten neben einer Millimeterskala digital fotografiert (Sony Cybershot DSC W40). Diese ersten vier Scheiben stellen den Bereich distal der Ligatur dar, während sich die anderen beiden Scheiben bereits im Herzklappen- und Vorkammerbereich befinden.

Folgende Areale können unterschieden werden:

weiß: Infarktgebiet, d.h. Gewebe, welches durch fehlende Sauerstoffzufuhr endgültig zugrunde gegangen ist. Dieser Bereich stellt den irreversibel geschädigten Anteil der „area at risk“ (AaR) dar.

rot: Ein durch die 30minütige Ligatur der LAD betroffener Bereich, der trotz Ischämie noch vitale Zellen enthält. Er bildet den reversibel geschädigten Anteil der „area at risk“.

blau: „Area non at risk“ (AnaR), d.h. der Bereich des Herzens, der von der Ligatur der LAD und dadurch entstehender Ischämie nicht betroffen ist.

Die Größenbestimmung der Areale erfolgt mittels des Bildverarbeitungsprogramms NIS-Elements (Nikon GmbH, Deutschland).

Folgende Flächen sind von Interesse:

- Fläche des linken Ventrikels
- Ausmaß des Infarkts
- Größe der AaR

Aus diesen Werten kann die Infarktfläche bezogen auf die AaR bzw. den linken Ventrikel bestimmt werden (siehe Abb.15 und 16).

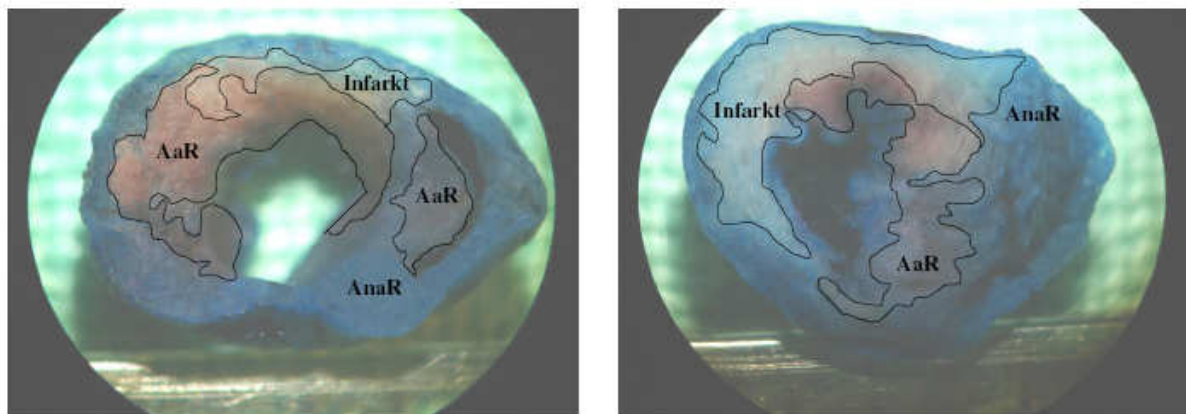


Abb.15: Quantifizierung der Infarktnarbe im Verhältnis zum Ischämiegebiet (AaR)

Die links abgebildete Herzscheibe zeigt eine größere Infarktfläche als die rechte Herzscheibe. AaR – „area at risk“; AnaR – „area non at risk“

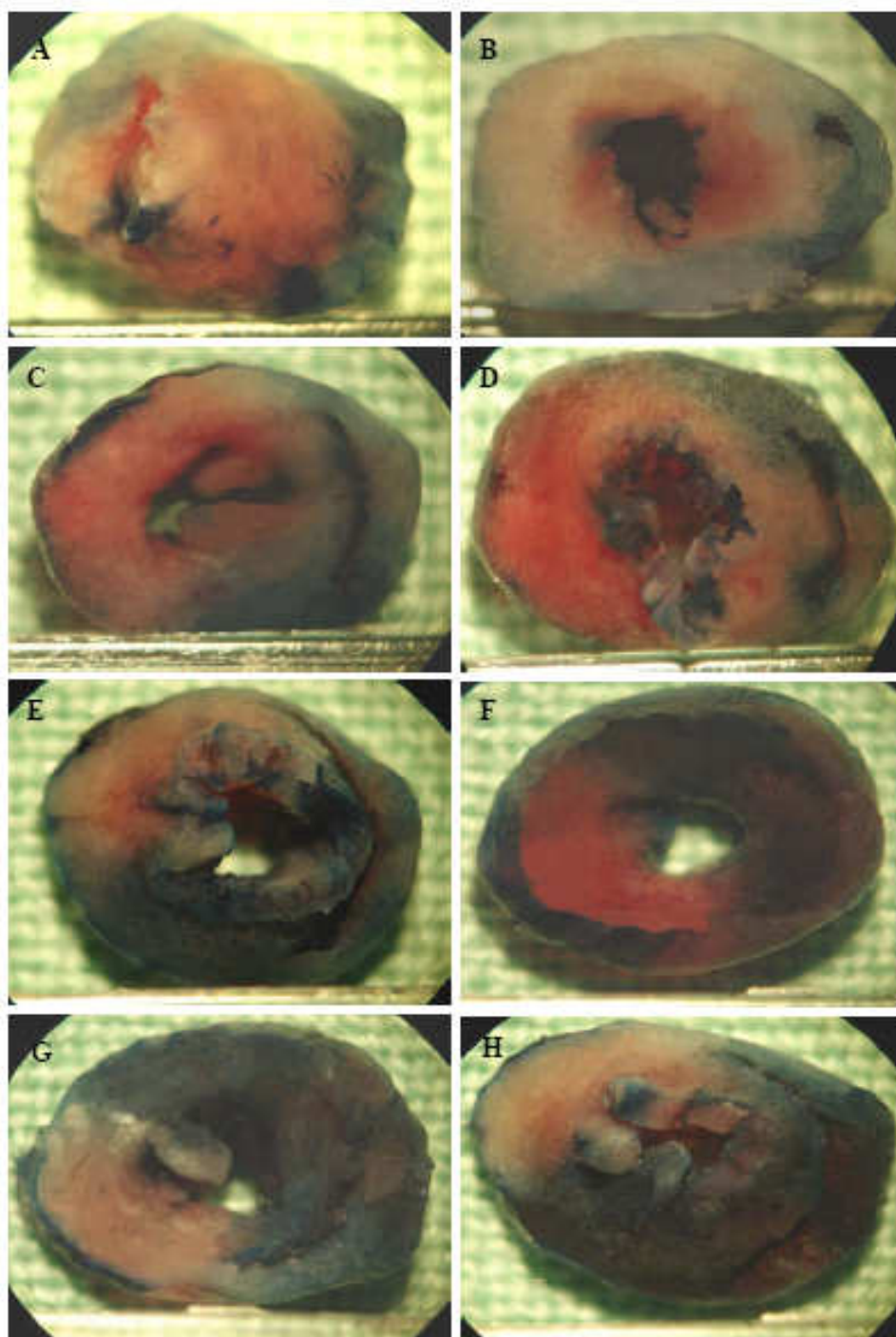


Abb.16: Infarkttnarbe und Ischämiegebiet 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion
Infarktgebiet und AaR sind durch TTC- und Evans Blue-Färbung deutlich erkennbar:
AaR – „area at risk“; AnaR – „area non at risk“; TTC - Triphenyltetrazoliumchlorid

Schnitt 1 (A): Aufsicht von außen auf den Apex. Die AaR (rot) ist deutlich von der AnaR (blau) abgrenzbar.

Schnitt 2 (B): Ansicht des Apex von innen: Da die Evans Blue-Lösung bei der Färbung in das Lumen des linken Ventrikels injiziert wird, färbt sich die Innenauskleidung blau an. In diesem Schnitt nimmt das Infarktgebiet (weiß) die größte Fläche ein.

Schnitt 3 (C): Der rechte Ventrikel ist blau angefärbt und somit von dem Infarkt nicht betroffen. Der linke Ventrikel ist fast vollständig ischämisch geschädigt: AaR (rot) und Infarkt (weiß).

Schnitt 4 (D): Der reversibel geschädigte Anteil des linken Ventrikels (rot) ist deutlich vom irreversibel geschädigten Gebiet (Infarkt: weiß) zu unterscheiden.

Schnitt 5 (E): Der von der Ischämie nicht betroffene Bereich (AnaR: blau) überwiegt in dieser Aufsicht.

Schnitt 6 (F): Die blaue AnaR ist gut von der roten AaR abzugrenzen.

Schnitt 7 (G): Die größte Fläche nimmt die blaue AnaR ein. Der restliche Anteil des linken Ventrikels besteht aus irreversibel geschädigtem Infarktgebiet.

Schnitt 8 (H): Ähnlich wie bei Schnitt 7 besteht dieser Herzquerschnitt zum großen Teil aus AnaR. Circa ein Drittel des linken Ventrikels ist von der Ischämie betroffen.

3.2.5. Sonographische Untersuchung des linken Ventrikels

Die Mäuse werden sieben Tage nach operativ erzeugter myokardialer Ischämie/Reperfusion sonographisch untersucht. Die Untersuchung fand mit freundlicher Unterstützung von Prof. S. Engelhardt vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München in seinem Labor in Würzburg statt.

Die Anästhesie der Maus erfolgt mittels einer Injektionsnarkose. Dazu wird der Maus intraperitoneal 2,5%iges 2,2,2Tribromethanol (Avertin®, Aldrich, Deutschland) in einer Dosierung von 10µl/g Körpergewicht verabreicht.

Nach Verlust des Stellreflexes wird die Maus an der ventralen Thoraxwand mit Enthaarungscreme (Balea body, Karlsruhe, Deutschland) enthaart.

Anschließend wird die Maus in Rückenlage auf einer Plattform gelagert und die Gliedmaßen mit Klebeband (Leukofix®, BSN medical GmbH, Deutschland) fixiert.

Die Augen werden zum Schutz vor Austrocknung mit einer Augensalbe (Bepanthen®, Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) benetzt. Während des gesamten Untersuchungszeitraums werden Körpertemperatur, Herz- sowie Atemfrequenz mittels Elektrodenkontakt (electrode cream®, GE Medical systems, Freiburg, Deutschland) an den Extremitäten überwacht.

Auf die enthaarte Hautstelle sowie den Schallkopf wird ein Ultraschallgel (Aquasonic Clear®, Parker Laboratories Inc., New Jersey, USA) aufgetragen.

Die Untersuchung erfolgt mit einem Ultraschallgerät (VEVO 770, Visual Sonics, Toronto, Kanada) mit 30MHz Schallkopf.

Der Schallkopf wird links parasternal aufgesetzt. Zunächst wird der linke Ventrikel im B-Mode in der Längsachse dargestellt und aufgezeichnet. An der Stelle des größten Durchmessers erfolgt die Darstellung im Querschnitt und anschließend im M-Mode. Kennzeichnende Folgen eines Myokardinfarkts, wie Aneurysmenbildung oder Wandbewegungsstörungen sind bereits im B-Mode sichtbar. Pro Maus werden jeweils drei Videos der Längsachse aufgezeichnet.

Planimetrisch werden aus diesen Aufnahmen die enddiastolischen sowie endsystolischen Flächen der Längsachse ermittelt (NIS-Elements, Nikon GmbH, Deutschland) (siehe Abb.17). Pro Aufnahme werden diese Parameter dreimal bestimmt. Aus diesen Größen wird anschließend für jede Maus der Mittelwert berechnet.

Aus diesen Werten kann das sogenannte „fractional area change“ (FAC), d.h. die linksventrikuläre fraktionelle Faserverkürzung ermittelt werden. Es ist eine Bestimmungsgröße für die Kontraktionsfähigkeit des Ventrikels und ein wichtiges Maß zur Bestimmung der Ventrikelfunktion.

Das FAC wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{FAC in \%} = \frac{\text{LVEDF} - \text{LVESF}}{\text{LVEDF}} \times 100$$

LVEDF = linksventrikuläre enddiastolische Fläche

LVESF = linksventrikuläre endsystolische Fläche.

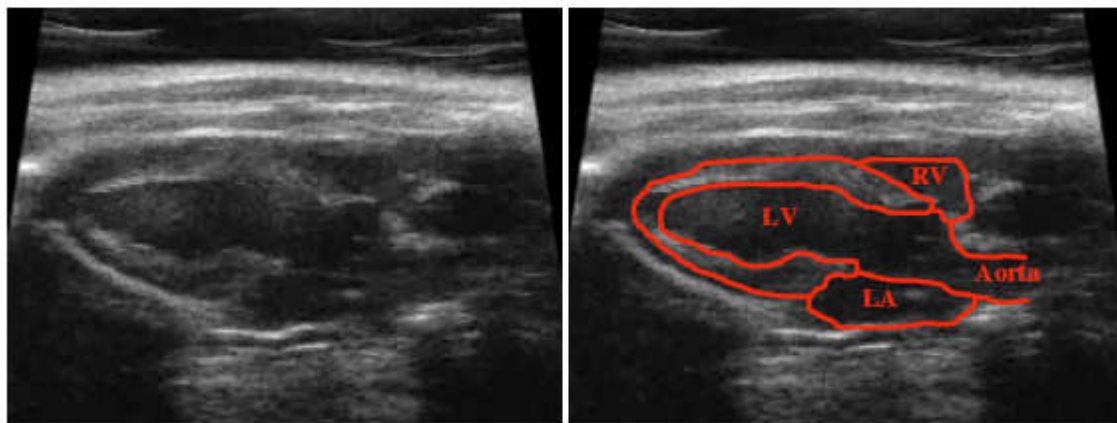


Abb.17: Bestimmung der enddiastolischen Fläche des linken Ventrikels.

Durch planimetrische Ausmessung der enddiastolischen sowie endsystolischen Ventrikelflächen der Längsachse kann die linksventrikuläre Faserverkürzung bestimmt werden.

LA - linker Vorhof; LV – linker Ventrikel; RV – rechter Ventrikel

3.2.6. Immunhistochemie

3.2.6.1. Material

Geräte

pH-Meter	IKA-Labortechnik, Staufen i.Br., Deutschland
Nikon-Mikroskop	NIKON GmbH, Deutschland
Mikrowelle	Bosch, Deutschland

Verbrauchsmaterial

Falcon-Zentrifugenröhrchen	Greiner, Deutschland
Objektträger	25x75x1mm, Super Frost®Plus, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Deckgläschen	18x18mm, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Einwegpipetten aus Glas	Corning, USA
Pipettierhilfe	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorfcups 1,5 und 2,5ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Liquid Blocker	Science Service, Japan

Puffer

PBS Waschpuffer	“Phosphat buffered saline” PBS Tabletten für jeweils 500ml Millipore Invitrogen Corporation, UK
Tween-PBS Waschpuffer (0,5% Tween)	“PBS with Tween” Polyoxyethylenesorbitanmondaurat®, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Citratpuffer (pH 6,0):

41ml 0,1M Natriumcitrat
9ml 0,1M Zitronensäure

450ml destilliertes Wasser

AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH,
Steinheim, Deutschland
Millipore Corporation, Billerica, USA

Reagenzien und Lösungen

Destilliertes Wasser

Millipore Corporation, Billerica, USA

Methanol

Merck KG, Darmstadt, Deutschland

Wasserstoffperoxid (30%)

Merck KG, Darmstadt, Deutschland

BSA (1%)

Albumin bovine serum, Fraction V, $\geq 96\%$,
SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
Steinheim, Deutschland

DAB (Dako)

20 μ l DAB-Chromogen pro 1ml Substratpuffer
DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

StreptABComplex/HRP (DakoCytomation):

1 Tropfen Reagenz A und 1 Tropfen Reagenz
B pro 5ml TBS (pH 7,6)
30min stehen lassen
DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

Biotin Blocking System

DakoCytomation, Dako, USA

Ethanol (99%)

SAV, Flintsbach, Deutschland

Roti-Histol

Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe,
Deutschland

Hämalaunlösung

sauer, nach Mayer (Mayers hemalaun solution)
Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe,
Deutschland

Rabbit Serum

DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

Primär-Antikörper

rat-anti-mouseCD147
abcam, 1mg/ml

Sekundär-Antikörper

biotinylated rabbit-anti-rat
DakoCytomation (0,72mg/ml)

Isotyp-Kontrolle

Rat IgG1
abcam, 500 μ g/ml

Eukitt®

O.Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland

3.2.6.2. Methode

Da homozygot defiziente CD147-Mäuse (CD147^{-/-}) schwierig zu züchten sind, werden für unsere Versuche heterozygote Tiere genutzt. Deren Basis-CD147-Expression wurde bisher noch nicht untersucht.

Durch Anwendung der Immunhistochemie kann die CD147-Expression mithilfe der DAB-Methode in verschiedenen Organen vergleichend bestimmt werden.

Jeweils drei CD147^{+/-}-Mäusen und deren Wildtypkontrollen wurden nach Euthanasie Leber sowie Milzen entnommen, entwässert und in Paraffin eingebettet.

Mithilfe des Mikrotoms wurden Paraffinschnitte in einer Dicke von 4µm angefertigt, ins Wasserbad gelegt und auf beschichtete Objektträger aufgetragen. Dabei werden auf jedem Objektträger drei Schnitte nebeneinander angeordnet, so dass neben der anti-CD147-Färbung auch eine IgG- und PBS-Kontrolle durchgeführt werden kann. Anschließend wurden diese getrocknet.

Die Entparaffinierung und Rehydrierung erfolgt durch das zweimal jeweils zehnminütige Aufbewahren der Schnitte in Roti-Histol. Daraufhin folgt die absteigende Ethanolreihe, in der die Objektträger je fünf Minuten durch 100%, 95% sowie 70%iges Ethanol geführt werden. Anschließend werden die Schnitte in Aqua dest. aufbewahrt.

Um das Antigen zu demaskieren, werden die Präparate in der Mikrowelle 15 Minuten in Citratpuffer gekocht. Danach werden mehrere Minuten zum Abkühlen der Schnitte benötigt.

Zur Ausschaltung der Gewebssperoxidase werden die Objektträger für 15 Minuten in 3%igem H₂O₂ aufbewahrt. Es folgt ein dreimaliges Waschen in 0,5%igem Tween-PBS für jeweils zwei Minuten.

Damit die verschiedenen Reagenzien nicht ineinander überlaufen, werden die einzelnen Schnitte mit einem Liquid Blocker umrandet.

Zur Vermeidung unspezifischer Blockierungen wird Avidin auf die Schnitte pipettiert und für zehn Minuten dort belassen. Anschließend werden die Präparate in Tween-PBS gewaschen. Das darauffolgend aufgetragene Biotin verbleibt für zehn Minuten auf den Schnitten. Wieder werden die Objektträger in Tween-PBS gespült.

80µl 10%iges Rabbit-Serum auf jeden Schnitt aufgetragen, da Kaninchen zur Erzeugung des zweiten Antikörpers diente. Das Rabbit-Serum verbleibt für 30 Minuten auf den Präparaten und wird danach nur abgekippt.

Für den immunhistochemischen Nachweis von CD147 wird „rat-anti-mouseCD147“ als Primärantikörper verwendet. Dieser wird 1:50 verdünnt in 1%igem BSA in einer Menge von 80µl auf die jeweils linken Schnitte der Objektträger pipettiert. Zur Kontrolle wird „Rat-IgG1“ in entsprechender Verdünnung sowie PBS für die mittig und rechts gelegenen Schnitte verwendet. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde werden die Lösungen abgekippt und die Objektträger dreimal fünf Minuten in 0,05%igem Tween-PBS gewaschen.

Anschließend wird der Sekundärantikörper „biotinylated rabbit anti rat“ in der Verdünnung 1:300 in 1%igem BSA (jeweils 80µl) auf die Präparate aufgetragen. Nach 30 Minuten Einwirkzeit werden die Objektträger dreimal für je fünf Minuten in 0,05%igem Tween-PBS gespült.

Der StreptABComplex wird nach Herstellerangaben angesetzt. Es ist notwendig, dass die Herstellung des Komplexes 30 Minuten vor Verwendung geschieht, so dass die verschiedenen Bestandteile miteinander reagieren können.

Der StreptABComplex wird auf die Schnitte pipettiert und verbleibt dort für 30 Minuten. Daraufhin werden die Objektträger dreimal fünf Minuten in 0,05%igem Tween-PBS gewaschen.

Für die Diaminobenzidinreaktion wird DAB-Gebrauchslösung nach Angaben des Herstellers angesetzt. Die Schnitte werden mit jeweils 80 µl inkubiert. Abhängig von der Art des Gewebes tritt eine Braunfärbung der Präparate ein, die anschließend in Aqua dest. gespült werden.

Nochmals werden die Objektträger dreimal für zwei Minuten in 0,05%igem Tween-PBS gewaschen.

Zum Anfärben der Zellkerne werden die Objektträger zehn Sekunden in Hämalaun gestellt. Daraufhin erfolgt das zehnminütige Bläuen in laufendem Leitungswasser.

Die Entwässerung der Schnitte wird durch eine aufsteigende Alkoholreihe vollzogen. Dazu werden die Objektträger jeweils fünf Minuten durch 70%iges Ethanol, 95%iges Ethanol und 100%iges Ethanol geführt. Danach werden die Präparate zweimal für fünf Minuten in Roti-Histol gestellt und anschließend mit Eukitt eingedeckelt.

Mithilfe eines Mikroskops und Bildverarbeitungsprogramms können die immunhistochemischen Färbungen ausgewertet werden.

3.2.7. Histologische Untersuchung: Hämatoxylin-Eosin (HE) - Färbung

3.2.7.1. Materialien

Verbrauchsmaterial

Objektträger	25x75x1mm, Super Frost®Plus R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Deckgläschen	18x18mm R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland

Reagentien und Lösungen

Destilliertes Wasser	Millipore Corporation, Billerica, USA
Ethanol (99%)	SAV, Flintsbach, Deutschland
Roti Histol	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaunlösung	sauer nach Mayer (Mayers hemalaun solution) Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Eosin	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Eisessig	Merck KG, Darmstadt, Deutschland
Eukitt®	O. Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland

3.2.7.2. Methode

In dieser Arbeit wird die HE-Färbung als Übersichtsfärbung zur Untersuchung der Infarktnarbe genutzt.

Die Entparaffinierung erfolgt durch das zweimal zehnmündige Inkubieren der Präparate in Roti-Histol. Die Rehydrierung wird mittels einer absteigenden Alkoholreihe aus 100%, 95% sowie 70%igem Ethanol erreicht. Anschließend werden die Objektträger für fünf Minuten in destilliertes Wasser gestellt.

Zur Darstellung der basophilen Strukturen der Präparate, insbesondere Zellkerne mit enthaltener Desoxyribonukleinsäure (DNA), werden die Schnitte fünf Minuten in Hämalaun aufbewahrt. Danach werden die Objektträger kurz gespült und 15 Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt. Dabei schlägt die zunächst rötlich-braune Färbung durch Erhöhung des pH-Wertes (Bläuen) in den charakteristischen Blauton um.

Die Rotfärbung der azidophilen Bestandteile der Präparate, vor allem Zellplasmaproteine, erfolgt durch die dreiminütige Inkubation in Eosin, welches mit einem Tropfen Eisessig versetzt wurde.

Zur Dehydrierung werden die Objektträger durch eine aufsteigende Alkoholreihe von 70%, 80%, 90% und 100%igem Ethanol geführt. Danach werden die entwässerten Schnitte für drei Minuten in Roti-Histol geklärt und anschließend mithilfe von Eukitt® eingedeckelt.

3.2.8. Gewebezymographie

Die Zymographie dient der vorliegenden Studie zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von MMP2 und MMP9.

Das Verfahren der Zymographie lässt sich wie folgt zusammenfassen:

Jeweils gleiche Proteinmengen werden in die Taschen eines gelatine-haltigen Zymogramm-Gels pipettiert. Durch Anlegen einer Spannung wird die Proteinauftrennung gestartet. Dabei wandern die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes unterschiedlich weit in Richtung Kathode. Die Proteintrennung erfolgt bei 4°C, da die MMPs bei diesem Vorgang enzymatisch inaktiv sein sollen. Zur Identifizierung der Proteine dient ein Marker, der ebenfalls auf das Gel aufgetragen wird.

Anschließend wird das Gel über Nacht bei 37°C aufbewahrt. Bei dieser Temperatur erlangen die MMPs enzymatische Aktivität und zersetzen die Gelatine, die in diesem Bereich im Gel vorhanden ist. Durch Anfärbung der Gelatine entstehen an diesen Stellen die charakteristischen hellen Banden. Somit können die gewebeabbauenden Fähigkeiten der MMPs sichtbar gemacht werden. Je heller und breiter die Banden, umso größer ist die Menge an aktiven MMPs.

Durchführung der Zymographie:

Das entnommene Gewebe wird zerkleinert. Bei einer Temperatur von 4°C wird ein Gewebelysat hergestellt. Dafür wird das Gewebe für 18 Stunden in 0,5 Triton X-100 (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Deutschland) in PBS mit 0,01% Natriumacetat (Merck, Darmstadt, Deutschland) unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Nach der Zentrifugation (zehn Minuten, 4°C, 14000U/min) werden die Überstände abgenommen und die Proteinkonzentrationen gemessen (Bradford-Methode, BioRad-Assay). 100µg Protein sollen pro Probe aufgetragen werden. Die Proben werden zunächst zehn Minuten in „non-reducing sample buffer“ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) bei Raumtemperatur inkubiert. Als Gel dient ein Zymogramm-Gel (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland), welches Gelatine enthält. Für jede Versuchsgruppe werden drei Proben aufgetragen. Nachdem der Marker (Seebule Standard 2), die Kontrolle (HT 1080) und die Proben in die Taschen des Gels pipettiert wurden, wird der Gellauf mit 60V gestartet und später auf 80V erhöht. Die Proteine wandern abhängig von ihrem Molekulargewicht von der Anode zur Kathode. Die Spannung wird solange beibehalten, bis die Banden des Markers eine deutlich erkennbare Auftrennung zeigen.

Anschließend werden die Gele in eine mit Aqua dest. gefüllte Schale überführt und zweimal kurz gewaschen. Danach erfolgt die Überführung der Gele in eine neue Schale mit „renaturation buffer“ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und eine 30minütige Inkubation auf dem Schüttler. Daraufhin werden die Gele in „development buffer“ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) kurz gewaschen. Der „development buffer“ wird gewechselt und die Gele 30 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Nach erneutem Wechsel des „development buffer“ werden die Gele bei 37°C über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Morgen werden die Gele zweimal in Aqua dest. gewaschen und danach zehn Minuten auf dem Schüttler mit einer „Coomassie blue“-haltigen Lösung angefärbt. Daraufhin werden die Gele in Aqua dest. gewaschen und solange entfärbt (Gel Dry Drying Solution, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland), bis die weißen Banden auf dem blauen Hintergrund sichtbar werden. MMP2 ist bei 72kDa und MMP9 bei 92kDa sichtbar.

Die fertigen Zymographien werden in Cellophanfolien vakuumiert (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 12 bis 36 Stunden getrocknet und anschließend eingescannt.

Herstellung der Lösung „Coomassie Brilliant Blau“:

0,25g Coomassie blue (BioRad GmbH, München, Deutschland)
45ml Aqua dest. (Millipore Corporation, Billerica, USA)
45ml Methanol (Merck KG, Darmstadt, Deutschland)
10ml Eisessig (Merck KG, Darmstadt, Deutschland).

Die Auswertung erfolgt mit dem Programm Image® (ImageJ, USA). Es werden Fläche und Helligkeit der Banden berücksichtigt. Anhand dieser Daten können Rückschlüsse auf die enzymatische Aktivität der Matrix Metalloproteinasen gezogen werden.

3.2.9. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wird mit dem Programm SPSS 15.5 (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt.

Folgende Daten der sechs Versuchsgruppen sind für die Auswertung relevant:

- Prozentualer Anteil des Infarktgebietes an der Ausdehnung der „area at risk“
- Prozentualer Anteil des Infarktgebietes an der Gesamtfläche des linken Ventrikels
- Flächen der „area at risk“ von Versuchs- und Kontrollgruppe im Vergleich
- „Fractional area change“ der Versuchs- und Kontrollgruppe im Vergleich

Um die Gruppen miteinander vergleichen zu können, wird aus den jeweiligen Einzeldaten der arithmetische Mittelwert (MW) sowie der Standardfehler (SEM: standard error of mean) ermittelt. Der Standardfehler stellt die Streuung des Mittelwertes dar. Er wird als Quotient aus der Standardabweichung und der Wurzel des Stichprobenumfangs definiert.

Zur Bestimmung der Signifikanz dient der T-Test für die Mittelwertgleichheit unabhängiger Stichproben. Dabei wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von weniger als 0,05 ($p < 0,05$) als statistisch signifikant angesehen.

3.3. ERGEBNISSE

3.3.1. Untersuchung der CD147-Expression bei CD147-defizienten, heterozygoten Mäusen (CD147^{+/-}) vor myokardialer Ischämie/Reperfusion

3.3.1.1. Immunhistochemie

Um die Dichte der CD147-positiven Zellen in CD147^{+/-}-Mäusen zu untersuchen, wurden drei Mäuse pro Gruppe euthanasiert und Leber sowie Milzen extrahiert. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden diese Organe in Formaldehyd inkubiert, anschließend entwässert und in Paraffin eingebettet. Mithilfe des Mikrotoms wurden 4µm dicke Schnitte angefertigt und auf beschichteten Objektträgern getrocknet.

Die Darstellung der CD147-positiven Zellen geschieht nach folgendem Prinzip: Der Primärantikörper bindet an das transmembranal gelegene Protein CD147. Darauf folgend bindet der biotinylierte Sekundärantikörper an den primären Antikörper. Das Streptavidin des StreptABComplexes hat eine hohe Affinität zu Biotin. Das danach aufgetragene DAB-Substratchromogen ergibt an der Stelle des Zielantigens ein braunes Reaktionsendprodukt. Somit werden die CD147-positiven Zellen braun dargestellt, wogegen die Zellkerne durch Gegenfärbung mit Hämalaun blau werden. Die gefärbten Präparate wurden unter dem Lichtmikroskop fotografiert und ausgewertet. Es konnte festgestellt werden, dass die Dichte CD147-positiver Splenozyten (siehe Abb. 18 und 19) und Hepatozyten (siehe Abb.20) bei CD147^{+/-}-Mäusen verringert ist.

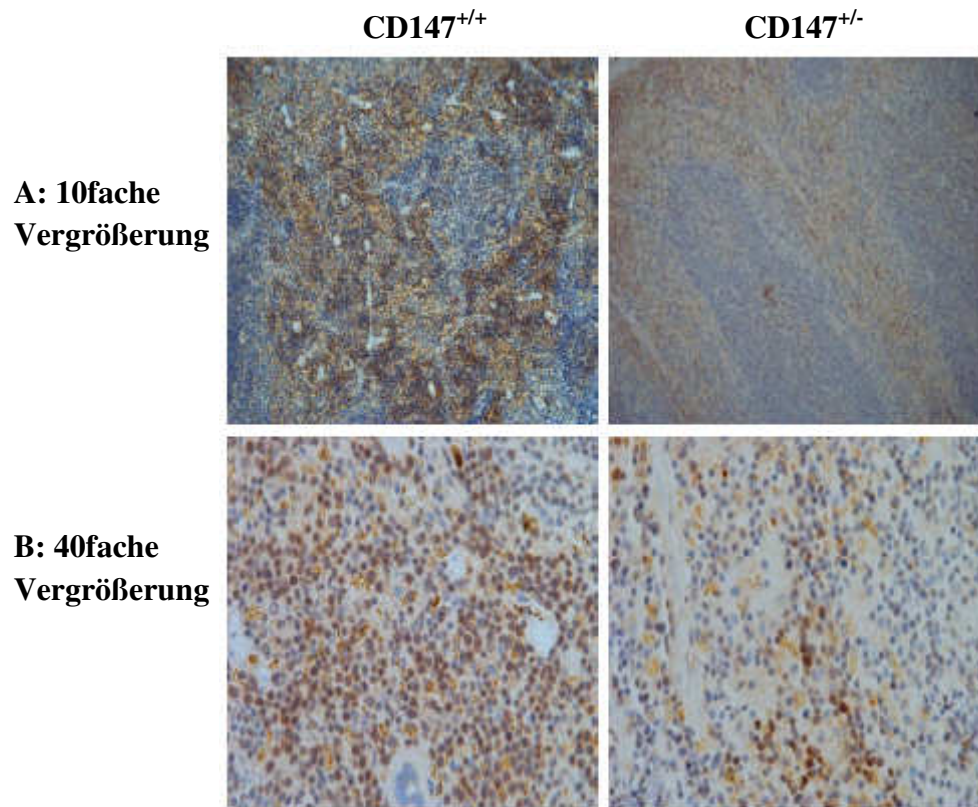


Abb.18: CD147^{+/+}Mäuse zeigen eine höhere Dichte an CD147-positiven Splenozyten.
Das Transmembranprotein CD147 wird mit einem Antikörper markiert und durch das DAB-Substratchromogen braun angefärbt. In den rechts dargestellten Milzen der CD147-defizienten Mäuse ist eine verminderte Braunfärbung bei beiden Vergrößerungen erkennbar.

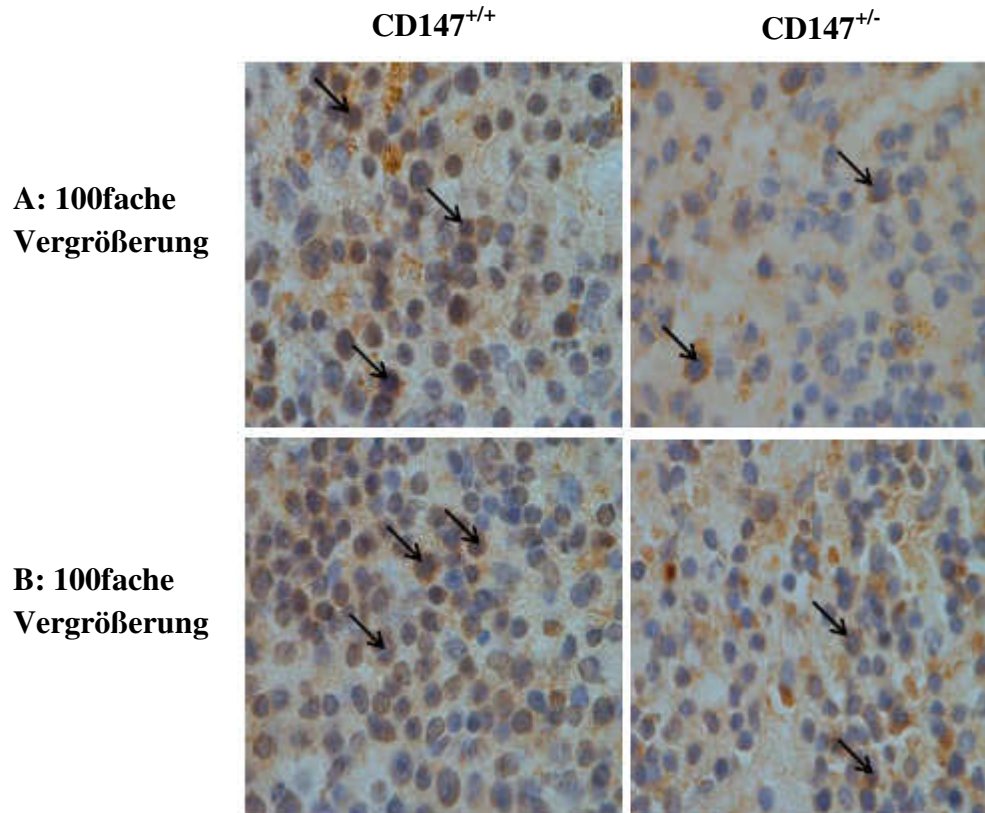


Abb.19: Die Anzahl CD147-positiver Splenozyten ist bei CD147^{+/-} Mäusen vermindert.

Immunhistochemische anti-CD147-Färbung der Milzen heterozygoter Mäuse in 100facher Vergrößerung. Die CD147-positiven Zellen sind mit Pfeilen markiert. Dabei weisen die Milzen der links dargestellten homozygoten Wildtypmäuse eine höhere Dichte an CD147-positiven Zellen auf.

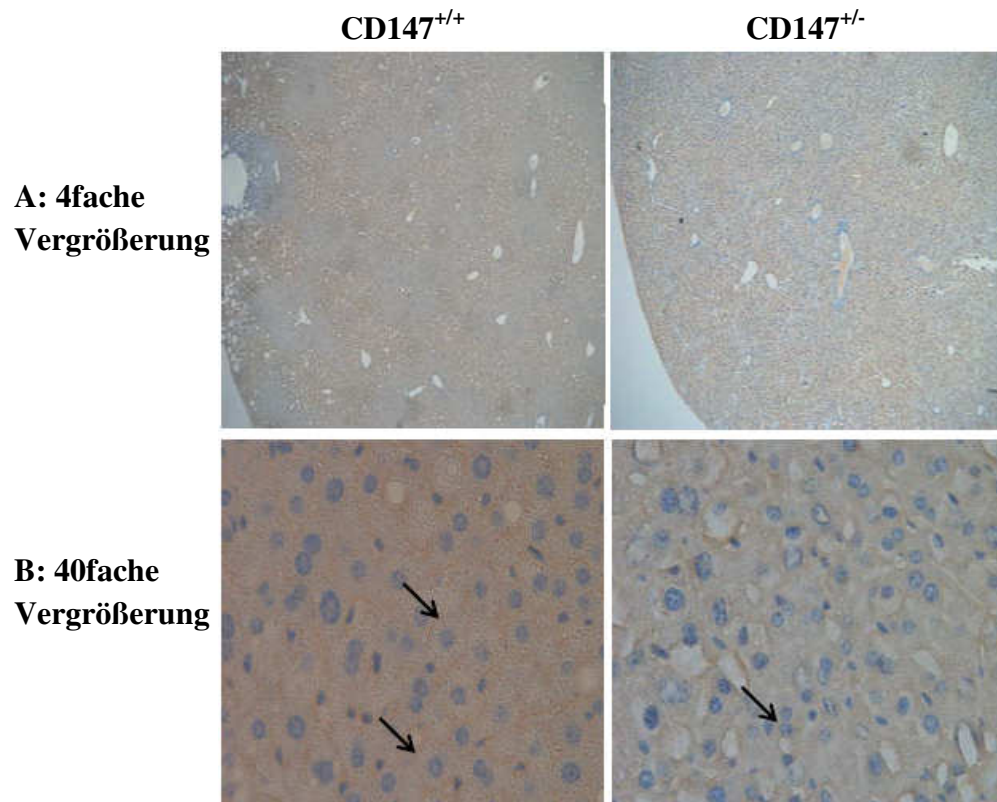


Abb.20: Die Dichte CD147-positiver Hepatozyten ist bei CD147^{+/-} Mäusen vermindert.

Da es sich bei CD147 um ein transmembranal gelegenes Protein handelt, werden durch das DAB-Substratchromogen vorrangig Zellwände braun angefärbt. Diese sind bei den rechts dargestellten CD147^{+/-}-Mäusen weniger deutlich erkennbar, als bei der links dargestellten Wildtypkontrolle.

3.3.1.2. Zymographie

Eine Funktion von CD147 ist die Induktion der Produktion von Matrix Metalloproteinasen. Somit könnte eine CD147-Defizienz zu einer verringerten Aktivität von Matrix Metalloproteinasen führen. Letzteres kann durch eine zymographische Untersuchung beurteilt werden.

Vier unbehandelten CD147^{+/-}-Mäusen werden die Herzen extrahiert. Als Kontrolle dienen vier Herzen von Wildtypmäusen. Aus diesen werden Gewebelysate hergestellt. Anschließend findet auf Zymogramm-Gel eine Proteinauftrennung statt. Durch Erhöhung der Temperatur werden die MMPs enzymatisch aktiv und bauen die im Gel enthaltene Gelatine ab. Anhand Größe und Intensität der entstehenden weißen Banden kann die enzymatische Aktivität bestimmt werden. Aufgrund der Tatsache, dass nach Myokardinfarkt vorrangig MMP9 und MMP2 aktiviert werden, wird die zymographische Untersuchung unbehandelter Mäuse ebenfalls auf diese beiden Matrix Metalloproteinasen beschränkt. Die MMP2-Bande ist bei 72kDa und die MMP9-Bande ist bei 92kDa auffindbar (siehe Abb.21).

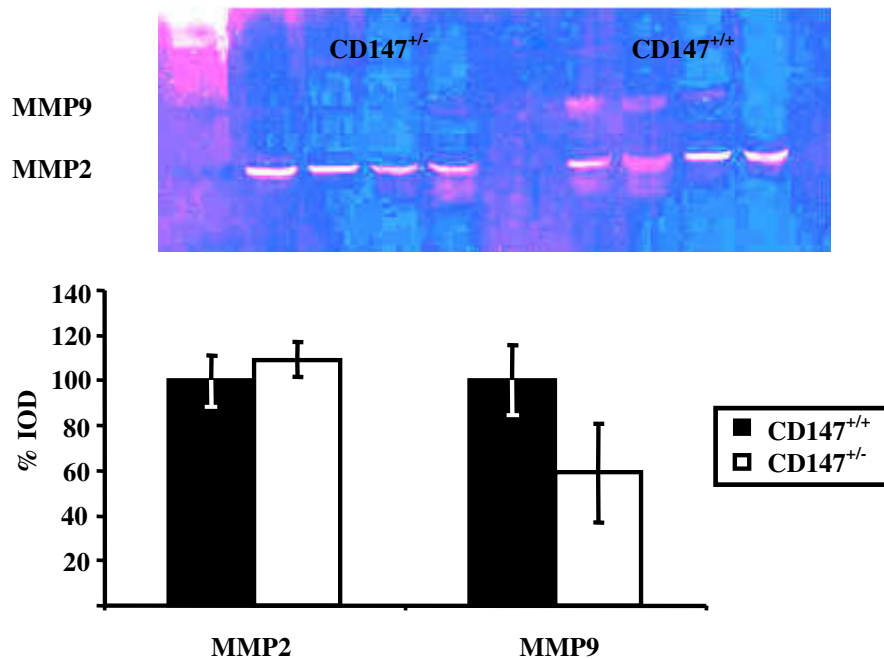


Abb.21: Die myokardiale MMP9-Aktivität von CD147^{+/-}-Mäusen ist im Trend verringert. Darstellung der MMP2- und MMP9-Aktivität in Myokardgeweben von CD147^{+/-}-Mäusen sowie Wildtypkontrolle mittels Zymographie. In der Auswertung werden die Banden der Wildtypkontrolle als 100% enzymatischer Aktivität definiert. Die Banden der CD147-defizienten, heterozygoten Mäuse werden mit diesen Daten verglichen. MMP2-Aktivitäten von CD147^{+/-}-Mäusen sind vergleichbar mit der Wildtypkontrolle (109,25% ± 7,92%). Dahingegen ist die MMP9-Aktivität der CD147^{+/-}-Mäuse reduziert (59,16% ± 21,91%). Diese Untersuchungen zeigen keine signifikanten Unterschiede der MMP-Aktivität zwischen CD147^{+/-}-Mäusen sowie Wildtypkontrolle.

IOD – integrated optical density; MMP – Matrix Metalloproteinasen

3.3.2. Überlebensrate und Komplikationen des chirurgischen Eingriffes

Von 85 operierten Mäusen versterben sechs während des Versuchszeitraums. Drei Mäuse entwickeln durch die Manipulation am Herzen starkes Kammerflimmern und versterben während der Operation. Bei einer Maus entsteht durch die Ligatur eine starke Blutung, die nicht gestillt werden kann. Zwei weitere Mäuse verenden zwei Tage nach Myokardinfarkt.

Zwei Herzen sind nicht auswertbar, da die Färbung fehlerhaft ist.

Bei neun Mäusen ist das Auftreten von Aszites in unterschiedlichen Schweregraden erkennbar. Zwei Mäuse zeigen Anzeichen einer Infektion des Respirationstraktes (siehe Tab.2).

Tab.2: Übersicht über aufgetretene Komplikationen während des Versuchszeitraums.

Versuchsnummern	Anzahl operierter Tiere	verstorben während des Versuchszeitraums	Aszites	Atemwegsinfektion	fehlerhafte Färbung
1	17		3		1
2	12			1	
3	18	2	2		1
4	11	1	1		
5	17	2	1		
6	12	1	2	1	

3.3.3. Versuchsnummer 1

Hierbei handelt es sich um sieben CD147^{+/-} Mäuse, die einer myokardialen Ischämie/Reperfusion unterzogen und 24 Stunden später euthanasiert wurden, um die Infarktgrößen zu bestimmen. Die Kontrollgruppe besteht aus sechs CD147^{+/+} Mäusen.

3.3.3.1. Infarktgrößen

Das berechnete Infarktareal (I) wird prozentual zum ischämischen Gebiet (AaR) und zur Fläche des linken Ventrikels (LV) ins Verhältnis gesetzt (siehe Tab.3).

Tab.3: Allgemeine Daten der Versuchsnummer 1 sowie Einzelergebnisse der myokardialen Ischämie/Reperfusion.

AaR - „area at risk“; LV - linker Ventrikel; I - Infarkt

Maus	Alter bei Operation	Gewicht Herz	% AaR/LV	% I/LV	% I/AaR
CD147 ^{+/-} 91	18 Wochen	0,14 g	31,82	7,89	27,23
CD147 ^{+/-} 92	18 Wochen	0,17 g	45,96	11,11	24,06
CD147 ^{+/-} 93	18 Wochen	0,17 g	45,14	6,23	13,25
CD147 ^{+/-} 94	18 Wochen	0,12 g	31,92	15,03	53,23
CD147 ^{+/-} 8	19 Wochen	0,14 g	59,3	16,38	29,68
CD147 ^{+/-} 10	19 Wochen	0,14 g	43,93	18,5	43,93
CD147 ^{+/-} 40	18 Wochen	0,16 g	65,56	8,09	10,94
CD147 ^{+/+} 12	18 Wochen	0,1 g	33,16	7,89	17,9
CD147 ^{+/+} 13	18 Wochen	0,09 g	37,61	19,18	48,84
CD147 ^{+/+} 14	18 Wochen	0,09 g	40,76	19,29	50,82
CD147 ^{+/+} 9	18 Wochen	0,11 g	52,5	11,74	22,54
CD147 ^{+/+} 23	17 Wochen	0,15 g	51,52	7,45	14,45
CD147 ^{+/+} 24	17 Wochen	0,14 g	59,11	28,57	43,5

Der Anteil des Infarktes an der „area at risk“ beträgt (%I/AaR):

- CD147^{+/-}: 28,9% ± 5,8%
- CD147^{+/+}: 33,01% ± 6,73% (siehe Abb.22).

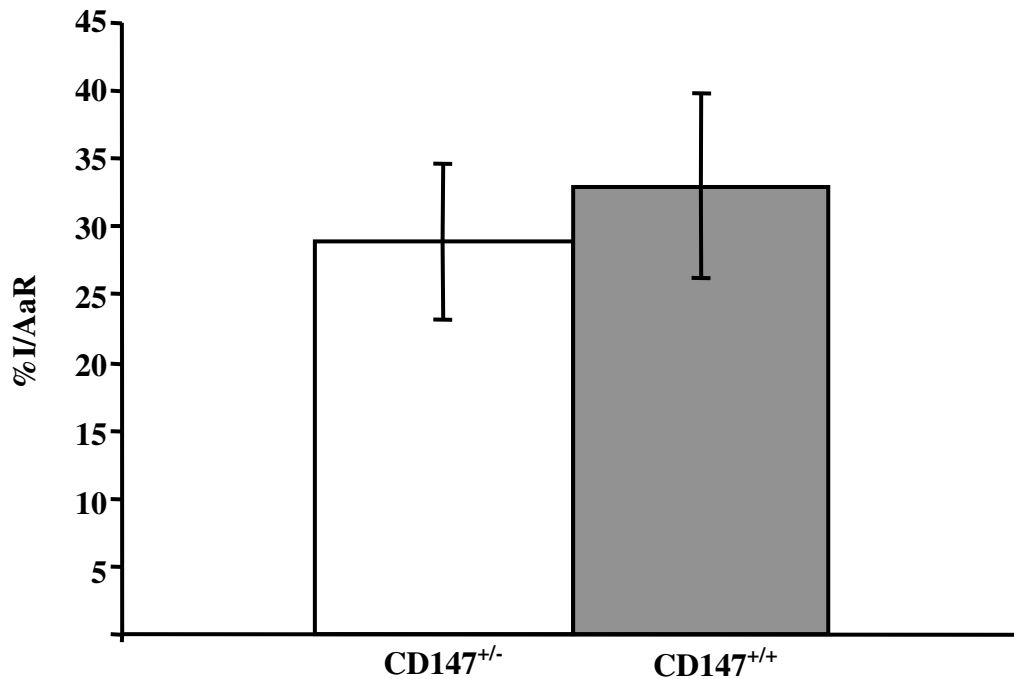


Abb.22: Bezogen auf das Ischämiegebiet haben CD147^{+/-}Mäuse eine im Trend verringerte Infarktgröße.

AaR – „area at risk“; I - Infarkt

Für den linken Ventrikel ergibt sich folgender Infarktanteil (%I/LV):

- CD147^{+/-}: 11,89% ± 1,8%
- CD147^{+/+}: 15,69% ± 3,34% (siehe Abb.23).

Sowohl das Verhältnis von Infarkt zur „area at risk“ als auch der Anteil von Infarkt zur Fläche des linken Ventrikels ergeben keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

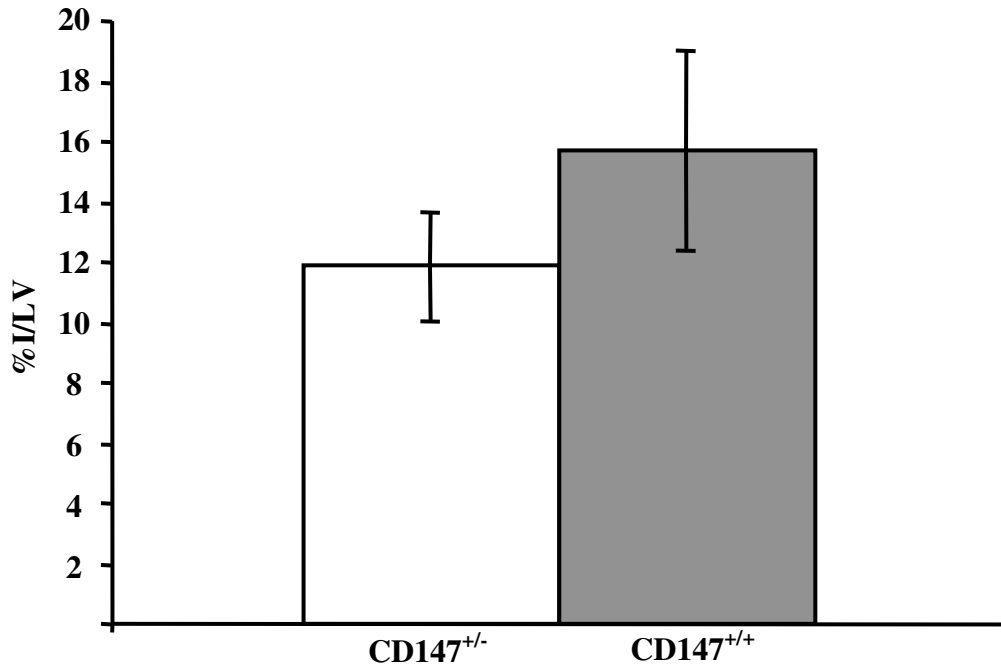


Abb.23: Bezogen auf die Fläche des linken Ventrikels ist die Infarktgröße bei CD147^{+/-} Mäusen im Trend verringert.

I – Infarkt; LV – linker Ventrikel

Wird der Anteil der „area at risk“ zur Fläche des linken Ventrikels ins Verhältnis gesetzt, ergibt sich ein Mittelwert von (%AaR/LV):

- 46,23% ± 4,79% bei CD147^{+/-} Mäusen
- 45,78% ± 4,11% bei CD147^{+/+} Mäusen (siehe Abb.24).

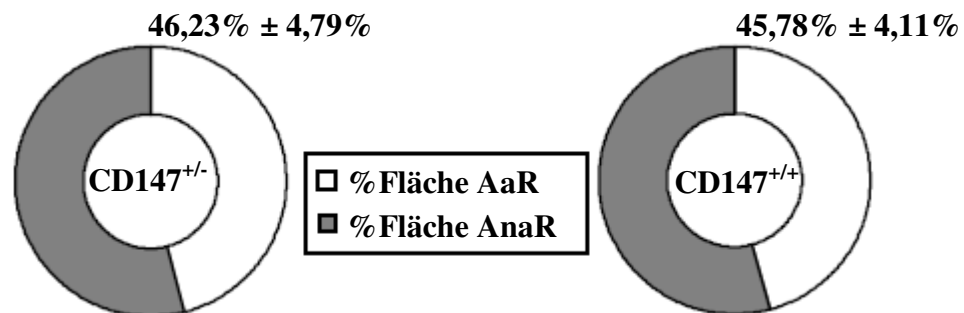


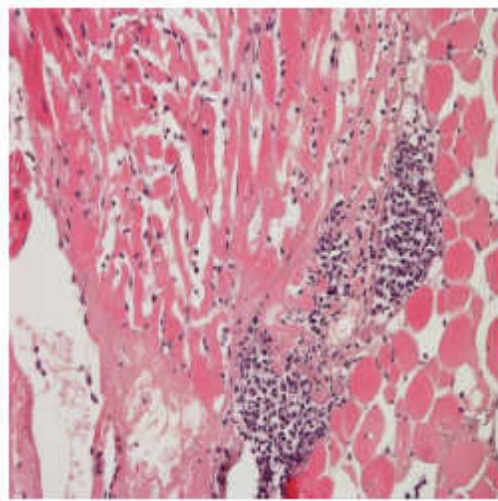
Abb.24: Der Anteil der „area at risk“ an der Gesamtfläche des linken Ventrikels ist in Versuchs- und Kontrollgruppe annähernd gleich.

Dabei stellt die „area non at risk“ das Areal dar, welches von der Ischämie nicht betroffen ist.
AaR – „area at risk; AnaR – „area non at risk“

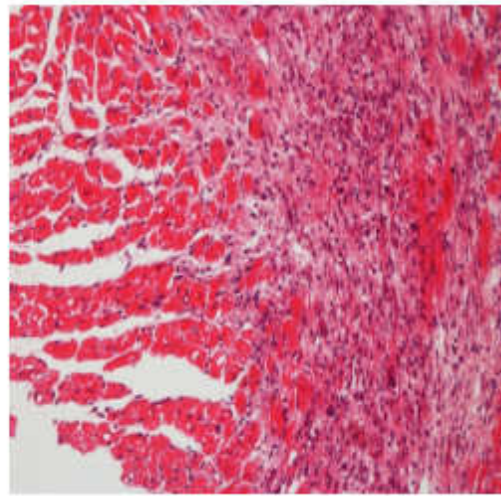
Zwischen den einzelnen Individuen existieren geringfügige Abweichungen im Verlauf der Koronararterien. Daraus könnten unterschiedliche Ausdehnungen der ischämischen Bereiche resultieren. Wird die Größe des Infarktes zur Fläche der „area at risk“ ins Verhältnis gesetzt (%I/AaR), werden diese Abweichungen ausgeglichen. Es resultiert eine objektive Gegenüberstellung der Infarktgrößen verschiedener Individuen und Gruppen.

Ähnliche Flächenausdehnungen der „area at risk“ im Verhältnis zum linken Ventrikel lassen auf eine Standardisierung der Operationstechnik schließen.

3.3.3.2. HE-Färbung



CD147^{+/+}



CD147^{+/-}

Abb.25: In den Infarkttrandzonen der CD147^{+/-}Mäuse ist eine geringere Dichte an Zellkernen erkennbar.

CD147^{+/+} - und CD147^{+/-}Mäuse, die jeweils 24 Stunden nach myokardialer Ischämie/Reperfusion euthanasiert wurden.

3.3.3.3. Zymographie

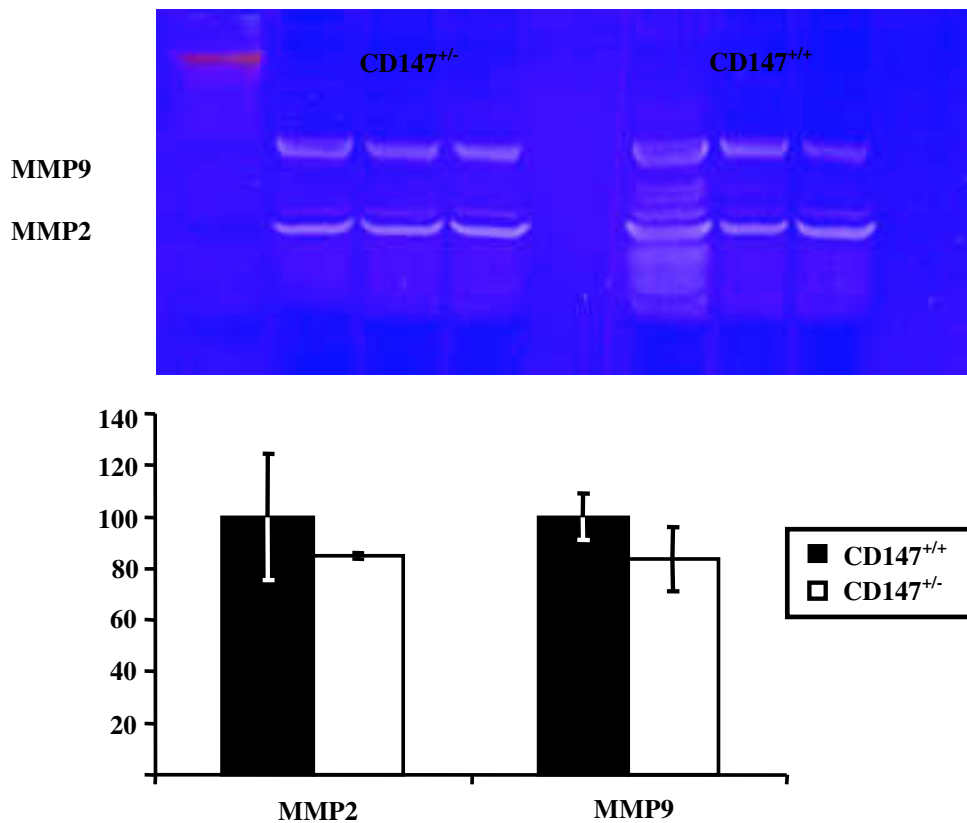


Abb.26: Die enzymatischen Aktivitäten der MMPs sind 24 Stunden nach myokardialer Ischämie/Reperfusion erhöht, zeigen aber keine signifikanten Unterschiede zwischen CD147^{+/-}Mäusen und der Wildtypkontrolle.

Die Aktivität beider MMPs ist gegenüber der von unbehandelten Mäusen sichtbar vermehrt (vergl. Abb.20). Wird die enzymatische Aktivität der MMPs des Wildtyps als 100% definiert, ist die Aktivität von MMP2 und MMP9 bei CD147^{+/-}Mäusen im Trend geringer (MMP2: 84,68% ± 1,28%; MMP9: 83,71% ± 12,59%).

MMP – Matrix Metalloproteinase

3.3.4. Versuchsnummer 2

Bei 6 CD147^{+/-}-Mäusen wurde chirurgisch eine myokardiale Ischämie/Reperfusion erzeugt. Nach einem Zeitraum von 7 Tagen erfolgte die Untersuchung der Herzfunktion mittels Echokardiographie. Anschließend wurden die Mäuse euthanasiert und die Infarktgrößen bestimmt (siehe Tab.4).

Die Kontrollgruppe besteht aus 5 CD147^{+/+}-Mäusen. Sie erhielten dieselbe Behandlung wie die Versuchsgruppe.

Tab.4: Allgemeine Daten dieser Versuchstiergruppe.

Maus	Alter bei Operation	Körpergewicht der Maus	Gewicht Herz
CD147 ^{+/-} 23	13 Wochen	24g	0,12g
CD147 ^{+/-} 22	13 Wochen	24g	0,11g
CD147 ^{+/-} 24	13 Wochen	25g	0,12g
CD147 ^{+/-} 65	19 Wochen	29,2g	0,11g
CD147 ^{+/-} 75	20 Wochen	27,6g	0,15g
CD147 ^{+/-} 76	20 Wochen	28g	0,15g
CD147 ^{+/+} 5	14 Wochen	28g	0,12g
CD147 ^{+/+} 6	13 Wochen	23,4g	0,11g
CD147 ^{+/+} 7	13 Wochen	20g	0,09g
CD147 ^{+/+} 9	11 Wochen	20g	0,12g
CD147 ^{+/+} 29	13 Wochen	25g	0,13g

3.3.4.1. Echokardiographie

Zur Darstellung und Quantifizierung einer möglichen Funktionsstörung des Herzens nach myokardialer Ischämie und Reperfusion wird eine echokardiographische Untersuchung durchgeführt. Diese dient unter anderem zur Bestimmung der endsystolischen und -diastolischen Durchmesser und somit auch zur Berechnung des sogenannten „fractional area change“ (FAC). Hierbei handelt es sich um eine Quantifizierung der linksventrikulären fraktionellen Faserverkürzung. Mithilfe dieses Wertes lässt sich eine eingeschränkte Herzpumpfunktion darstellen.

Die sonographische Untersuchung wurde jeweils am siebten Tag nach myokardialer Ischämie/Reperfusion durchgeführt.

Pro Tier wurden drei unterschiedliche Einstellungen mit jeweils drei Berechnungen des FAC gewählt, woraus das arithmetische Mittel berechnet wurde (siehe Tab.5).

ERGEBNISSE

Tab.5: Jeweilige Einzelwerte des FAC der untersuchten Mäuse in Versuchsnummer 2
FAC – „fractional area change“

	CD147 ^{+/-}						CD147 ^{+/+}				
Maus	22 ^{+/-}	23 ^{+/-}	24 ^{+/-}	65 ^{+/-}	75 ^{+/-}	76 ^{+/-}	29 ^{+/+}	5 ^{+/+}	6 ^{+/+}	7 ^{+/+}	9 ^{+/+}
FAC	50,17	61,19	48,38	33,74	22,65	21,94	23,78	19,92	31,88	24,88	31,16

Beim Vergleich der Mittelwerte des FAC von CD147^{+/-} und CD147^{+/+} entsteht folgendes Ergebnis:

- CD147^{+/-}: 39,68% ± 6,55%
- CD147^{+/+}: 26,32% ± 2,28%.

Die Herzpumpfunktion der Wildtypkontrolle ist gegenüber der der CD147^{+/-}-Mäuse signifikant eingeschränkt (siehe Abb.27).

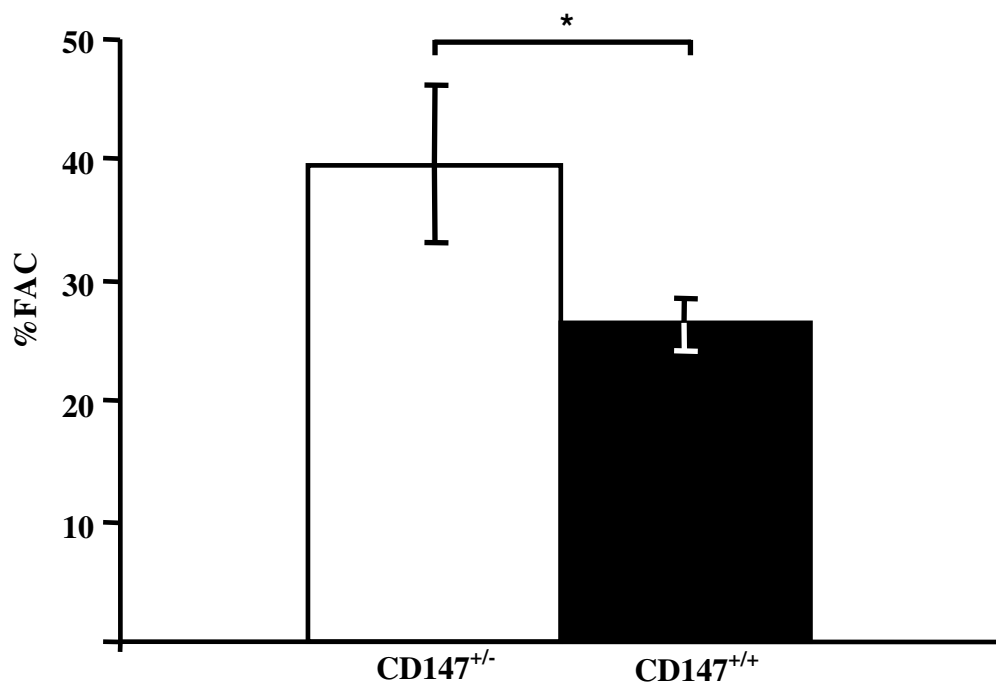


Abb.27: CD147^{+/-}-Mäuse haben sieben Tage nach myokardialer Ischämie/Reperfusion eine signifikant weniger beeinträchtigte Herzpumpfunktion.

FAC – „fractional area change“; * - p<0,05

3.3.4.2. Infarktgröße

Tab.6: Einzelwerte der Infarktgrößen.

AaR – “area at risk“; LV - linker Ventrikel; I - Infarkt

Maus	% AaR/LV	% I/LV	% I/AaR
CD147 ^{+/-} 23	53,91	2,64	8,02
CD147 ^{+/-} 22	68,24	7,29	12,56
CD147 ^{+/-} 24	34,89	7,57	23,96
CD147 ^{+/-} 65	45,17	10,66	24,16
CD147 ^{+/-} 75	82,28	22,46	28,88
CD147 ^{+/-} 76	68,89	19,18	27,46
CD147 ^{+/+} 5	41,1	11,2	26,3
CD147 ^{+/+} 6	73	17,57	26,49
CD147 ^{+/+} 7	81,31	29,5	37,4
CD147 ^{+/+} 9	57,68	22,05	41,75
CD147 ^{+/+} 29	71,97	19,86	30,6

Der Mittelwert der Infarktgrößen im Verhältnis zur mittleren “area at risk” beträgt (%I/AaR):

- CD147^{+/-}: 20,84% ± 3,47%
- CD147^{+/+}: 32,51% ± 3,06% (siehe Abb.28).

Für den Anteil der Infarktfläche an der Größe des linken Ventrikels ergeben sich folgende Werte (%I/LV):

- CD147^{+/-}: 11,63% ± 3,12%
- CD147^{+/+}: 20,04% ± 2,98% (siehe Abb.29).

Beide Ergebnisse zeigen eine signifikante Verringerung der Infarktgrößen von CD147^{+/-} Mäusen sieben Tage nach myokardialer Ischämie/Reperfusion verglichen mit deren Wildtypkontrolle auf.

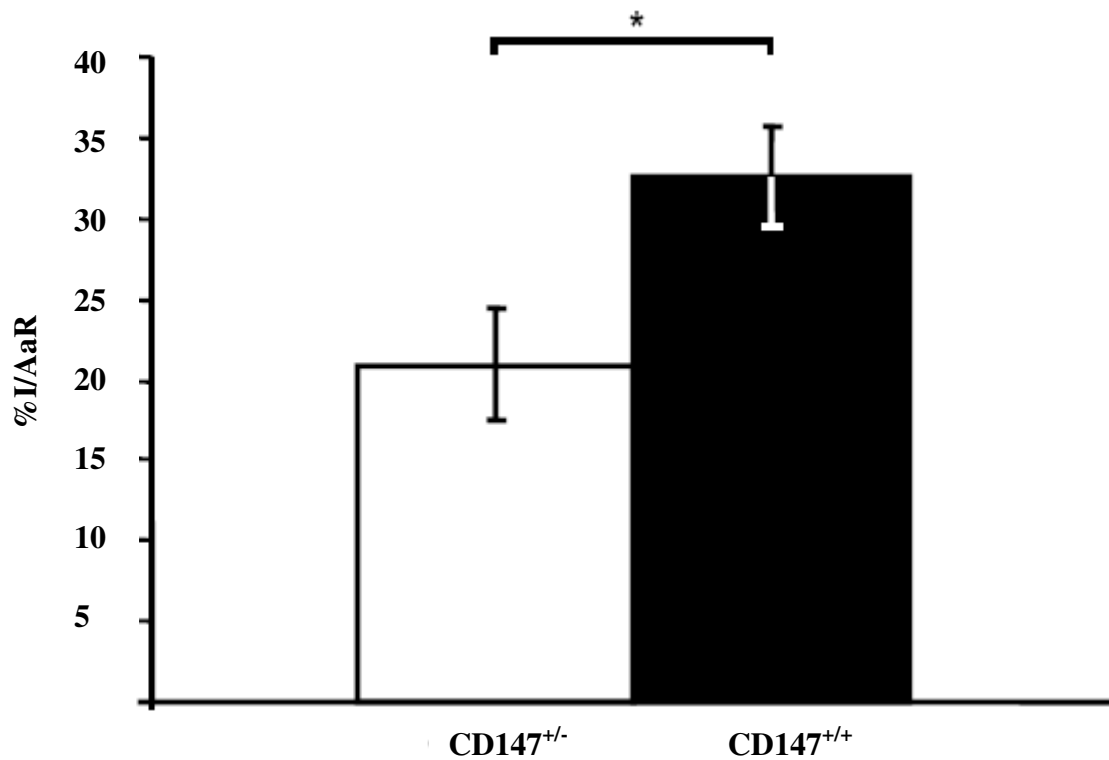


Abb.28: CD147^{+/-}Mäuse haben sieben Tage nach myokardialer Ischämie/Reperfusion eine signifikant verringerte Infarktgröße.

Berechnung des Infarktareals im Verhältnis zur „area at risk“.

AaR – „area at risk“; I – Infarkt; * - p<0,05

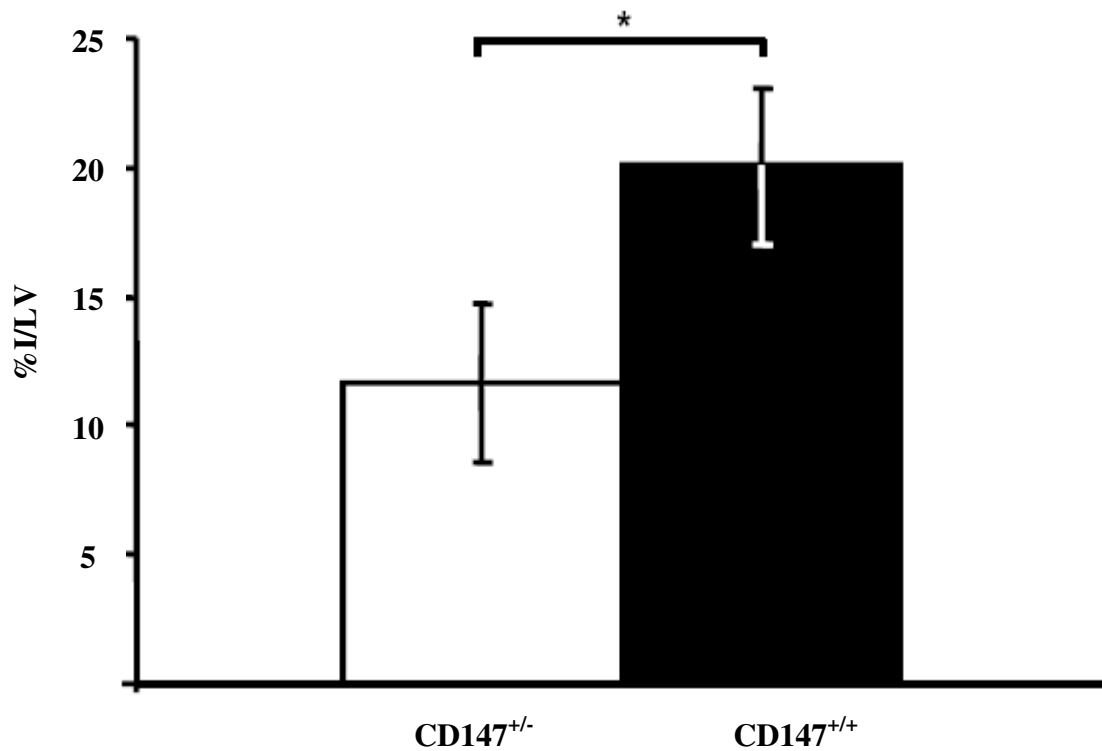


Abb.29: Der Anteil des Infarkts an der Fläche des linken Ventrikels ist bei CD147^{+/-} Mäusen sieben Tage nach myokardialer Ischämie/Reperfusion signifikant verringert. I – Infarkt; LV – linker Ventrikel; * - p<0,05

Wird die Fläche der „area at risk“ ins Verhältnis zur Größe des linken Ventrikels gesetzt, resultieren folgende mittlere Werte (%AaR/LV):

- CD147^{+/-}: 58,9% ± 7,13%
- CD147^{+/+}: 65,01% ± 7,08%.

Somit ist kein signifikanter Unterschied in den mittleren Ausdehnungen der „area at risk“ zwischen den heterozygoten Mäusen und deren Wildtypkontrolle vorhanden (siehe Abb.30).

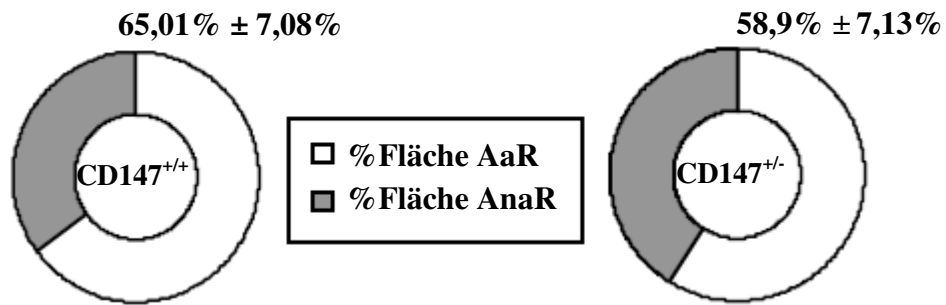


Abb.30: Die mittleren Anteile der „area at risk“ an der Fläche des linken Ventrikels ergeben zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied.
AaR – „area at risk; AnaR – „area non at risk“

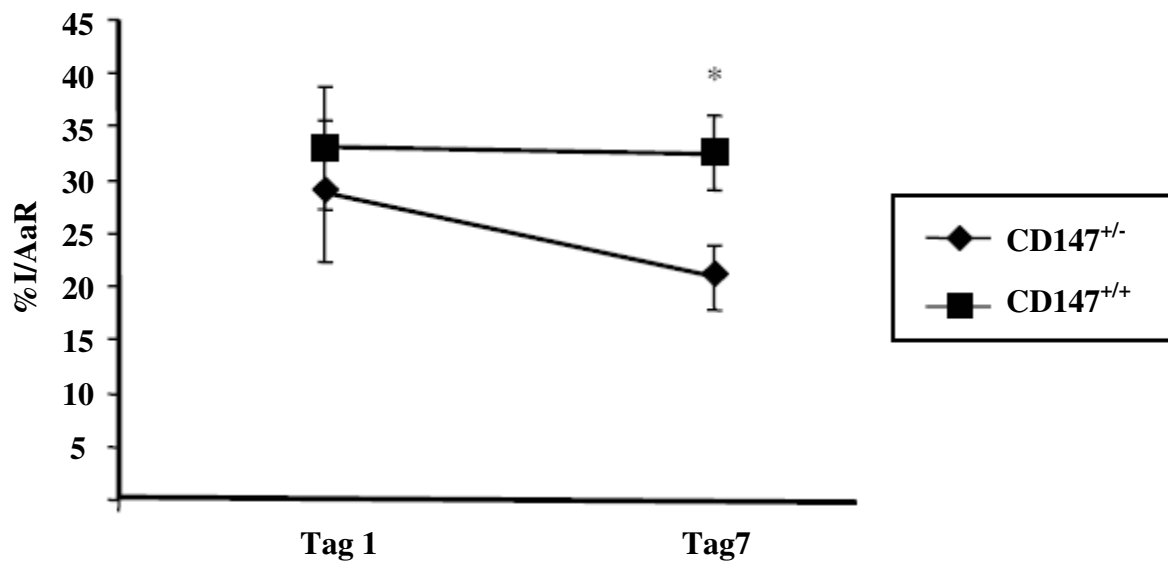


Abb.31: Mit längerer Dauer der Reperfusion verringert sich die mittlere Infarktgröße bei der CD147^{+/-} Maus.

Gegenüberstellung der Infarktgrößen von CD147^{+/-}Mäusen bzw. deren Wildtypkontrollen nach 24 Stunden sowie sieben Tagen nach Operation.

Während die Infarktgrößen der Wildtypkontrolle nahezu unverändert bleiben, verringert sich das Infarktgebiet der CD147^{+/-}Maus um fast ein Drittel.

AaR – „area at risk; I – Infarkt; * - p<0,05

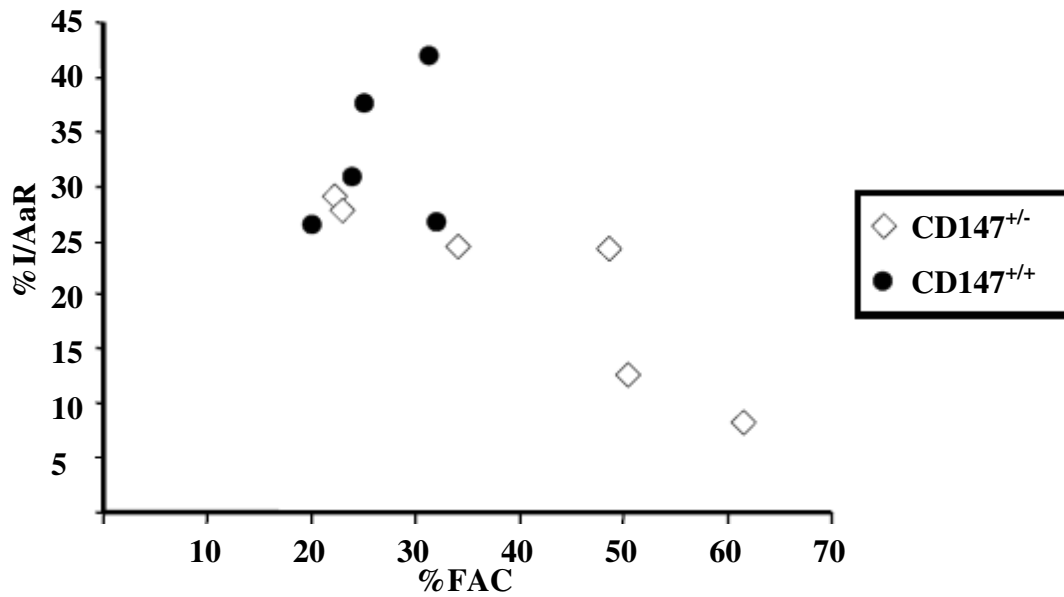
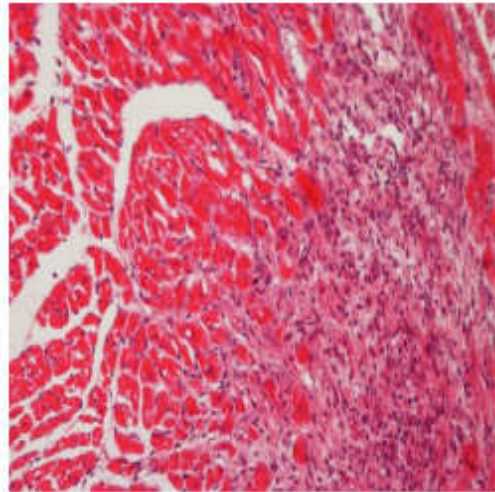
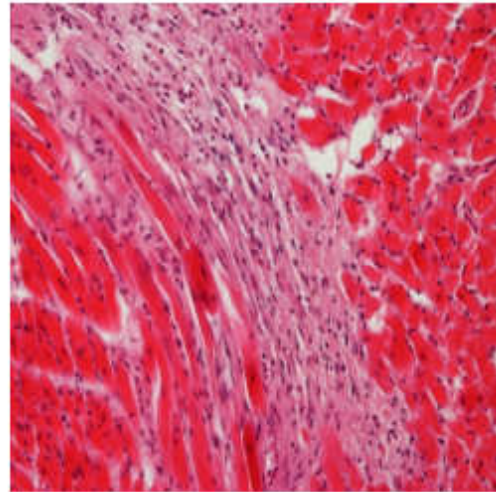


Abb.32: Die echokardiographisch bestimmte linksventrikuläre Verkürzungsfraction (%FAC) verbessert sich mit abnehmender Fläche des Infarktes.
AaR – „area at risk“; FAC – “fractional area change”; I – Infarkt

3.3.4.3. HE-Färbung



CD147^{+/+}



CD147^{+/-}

Abb.33: Die Dichte an Zellkernen in der Infarkttrandzone ist bei der CD147^{+/-}Maus sieben Tage nach myokardialer Ischämie/Reperfusion deutlich reduziert.
Exemplarische HE-Färbungen der Infarktareale von CD147^{+/-}- sowie CD147^{+/+}Mäusen sieben Tage nach myokardialer Ischämie/Reperfusion.

3.3.5. Versuchsnummer 3

Diese Gruppe besteht aus 6 C57Bl/6J-Mäusen, bei denen chirurgisch eine myokardiale Ischämie/Reperfusion erzeugt wurde. Jede Maus wurde eine Stunde vor, sowie sechs und 18 Stunden nach chirurgischem Eingriff mit anti-CD147-Antikörper behandelt. 24 Stunden nach der Operation wurden die Mäuse getötet und die Infarktgrößen ausgemessen (siehe Tab.7). Die Kontrollgruppe erhielt den IgG-Isotyp zu denselben Zeitpunkten vor und nach myokardialer Ischämie/Reperfusion.

3.3.5.1. Infarktgrößen

Tab.7: Allgemeine Daten der Versuchsnummer 3 sowie Einzelergebnisse der Infarktgrößenbestimmung.

AaR - „area at risk“; LV - linker Ventrikel; I - Infarkt

Maus	Behandlung mit CD147-	Alter bei OP	Gewicht Herz	%AaR/LV	%I/LV	%I/AaR
Maus 1	Antikörper	13 Wochen	0,11g	46,48	13,38	30,61
Maus 2	Antikörper	13 Wochen	0,11g	44,78	17,88	36,39
Maus 3	Antikörper	13 Wochen	0,11g	60,21	14,35	22,41
Maus 4	Antikörper	16 Wochen	0,1g	46,68	16,01	46,54
Maus 5	Antikörper	12 Wochen	0,11g	62,45	11,48	20,26
Maus 6	Antikörper	12 Wochen	0,1g	55,44	7,05	16,82
Maus 1	Isotyp	14 Wochen	0,13g	61,7	36,21	59,25
Maus 2	Isotyp	14 Wochen	0,11g	52,92	21,24	41,59
Maus 3	Isotyp	12 Wochen	0,12g	45,66	44,46	96,9
Maus 4	Isotyp	15 Wochen	0,12g	70,75	32,7	47,79
Maus 5	Isotyp	16 Wochen	0,1g	71,28	31,66	47,73
Maus 6	Isotyp	12 Wochen	0,1g	28,73	25,37	81,79
Maus 7	Isotyp	16 Wochen	0,1g	74,73	41,91	54,5

Folgende mittlere Werte ergeben sich für das Verhältnis Infarktgröße zum Bereich der „area at risk“ (%I/AaR):

- C57Bl/6J, behandelt mit anti-CD147-Antikörper: 28,84% ± 5,07%
- C57Bl/6J, behandelt mit CD147-Isotyp: 61,37 ± 3,05% (siehe Abb.34).

Der Anteil des Infarktareals an der Fläche des linken Ventrikels (%I/LV) beträgt für:

- C57Bl/6J, behandelt mit anti-CD147-Antikörper: $13,36\% \pm 0,99\%$
- C57Bl/6J, behandelt mit CD147-Isotyp: $33,36\% \pm 3,39\%$ (siehe Abb.35).

Somit ist die Infarktgröße in Prozent sowohl zum linken Ventrikel als auch zur „area at risk“ bei der mit anti-CD147-Antikörper behandelten Gruppe signifikant erniedrigt.

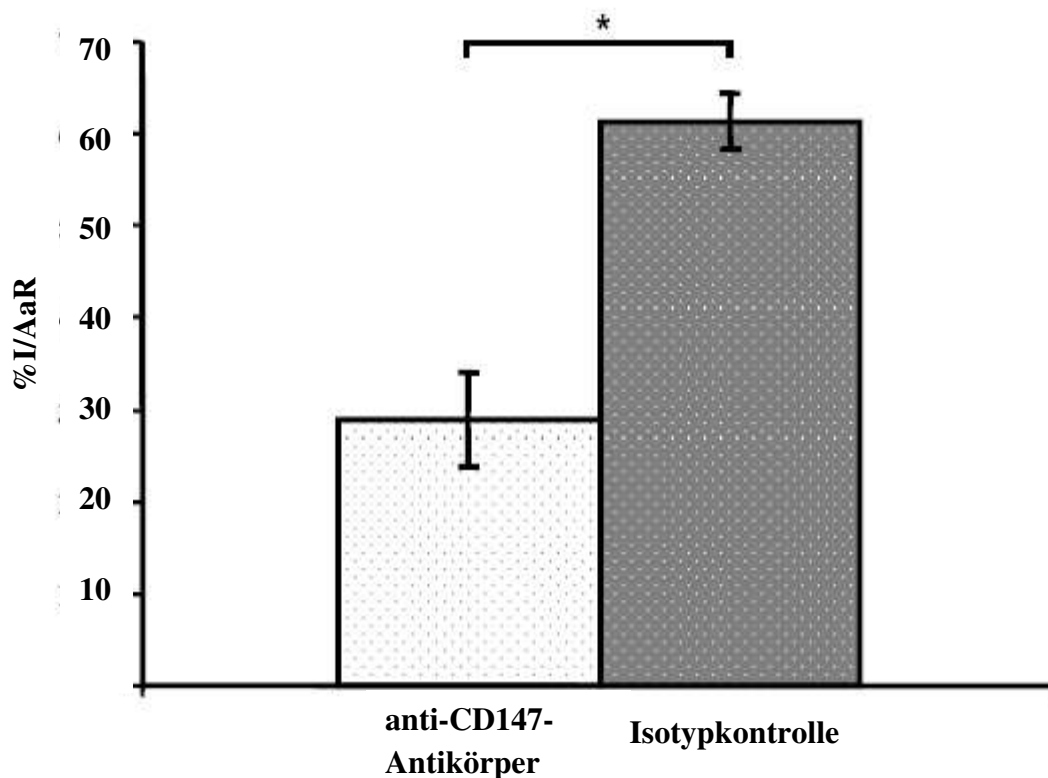


Abb.34: Der prozentuale Anteil des Infarktgebietes an der Ausdehnung der „area at risk“ ist bei den mit anti-CD147-Antikörper behandelten Mäusen 24 Stunden nach myokardialer Ischämie/Reperfusion signifikant verringert.

AaR – „area at risk“; I – Infarkt; * - $p < 0,05$

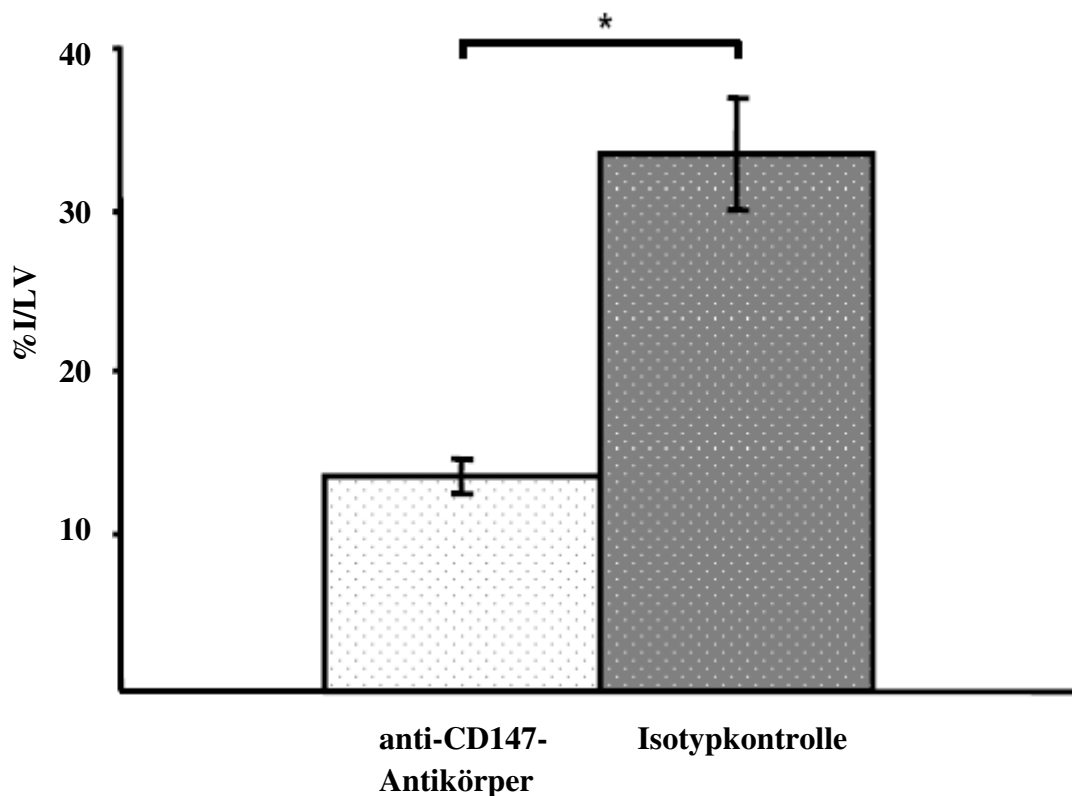


Abb.35: Bezogen auf die Fläche des linken Ventrikels ist das Infarktareal bei mit anti-CD147-Antikörper behandelten Mäusen 24 Stunden nach myokardialer Ischämie/Reperfusion signifikant verringert.

I – Infarkt; LV – linker Ventrikel; * - $p < 0,05$

Der Bereich der „area at risk“ hat einen mittleren Anteil am linken Ventrikel von (%AaR/LV):

- C57Bl/6J, behandelt mit anti-CD147-Antikörper: $52,67\% \pm 3,58\%$
- C57Bl/6J, behandelt mit CD147-Isotyp: $57,97\% \pm 3,97\%$.

Hiermit kann gezeigt werden, dass zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied in der Ausdehnung der „area at risk“ besteht (siehe Abb.36).

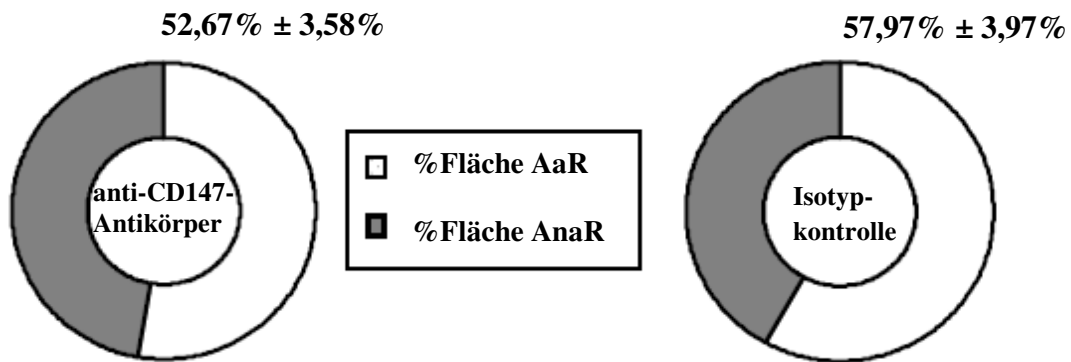


Abb.36: Der prozentuale Anteil der „area at risk“ an der Fläche des linken Ventrikels weist keinen signifikanten Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe auf.
AaR – „area at risk“; AnaR – „area non at risk“

3.3.5.2. Zymographie

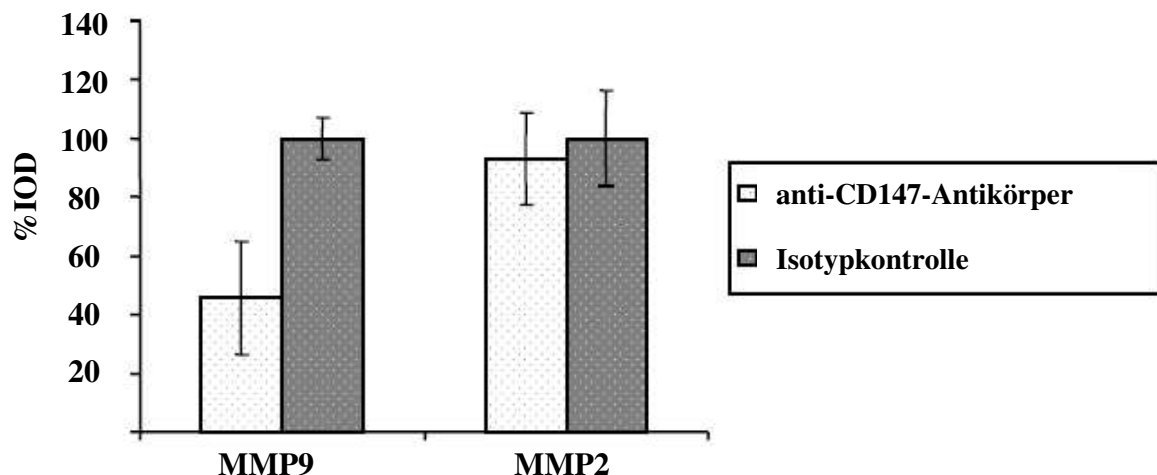
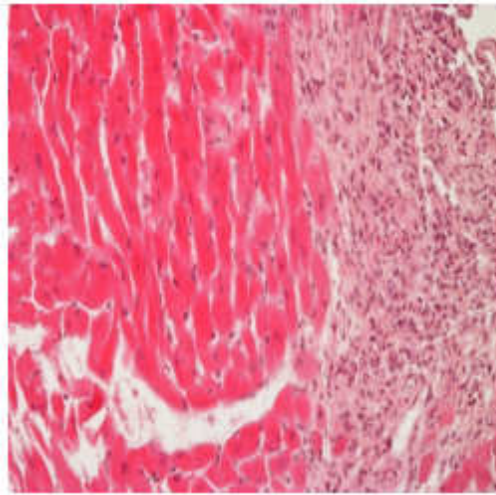


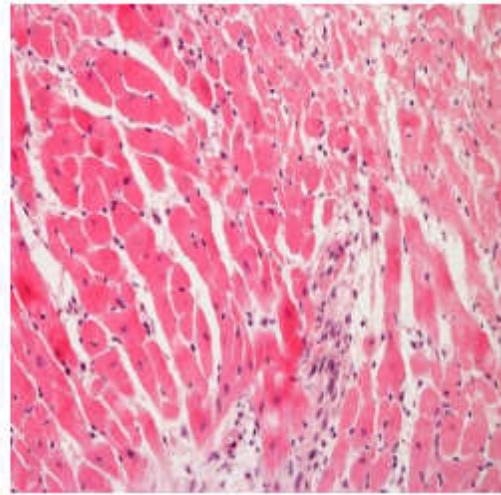
Abb.37: Die MMP9-Aktivität im Myokard von anti-CD147-Antikörper behandelten Mäusen ist 24 Stunden nach Operation gegenüber der Kontrollgruppe verringert. MMP2- und MMP9-Aktivitäten von anti-CD147-Antikörper behandelten Mäusen bzw. Isotypkontrollen 24 Stunden nach myokardialer Ischämie/Reperfusion. Wird bei der Auswertung die MMP-Aktivität der Isotypkontrolle als 100% definiert, ist die MMP9-Aktivität der mit anti-CD147-Antikörper behandelten Mäuse dem gegenüber verringert (45,54% ± 19,06%). Die MMP2-Aktivität ist dagegen annähernd gleich (92,9% ± 15,69%). n=2

MMP – Matrix Metalloproteinase; IOD – integrated optical density

3.3.5.3. HE-Färbung



Isotypkontrolle



anti-CD147-Antikörper

Abb.38: Neben einer deutlich kleineren Infarktnarbe ist bei den mit anti-CD147-Antikörper behandelten Mäusen eine geringere Dichte an Zellkernen im Infarktgebiet erkennbar.

24 Stunden nach myokardialer Ischämie und Reperfusion wurden die Mäuse euthanasiert und das Herzgewebe für die histologische Untersuchung aufbereitet.

3.3.6. Versuchsnummer 4

Es handelt sich um fünf C57Bl/6J-Mäuse, denen eine Stunde vor, sowie sechs und 18 Stunden nach myokardialer Ischämie anti-CD147-Antikörper verabreicht wurde. Darauf folgend erhielten die Tiere den anti-CD147-Antikörper einmal täglich. Sieben Tage nach dem chirurgischen Eingriff erfolgte eine Echokardiographie sowie Euthanasie und Infarktgrößenbestimmung (siehe Tab.8).

Die Kontrollgruppe aus 4 C57Bl/6J-Mäusen erfuhr dieselbe Behandlung – jedoch mit der Isotypkontrolle.

Tab.8: Allgemeine Daten dieser Versuchsnummer.

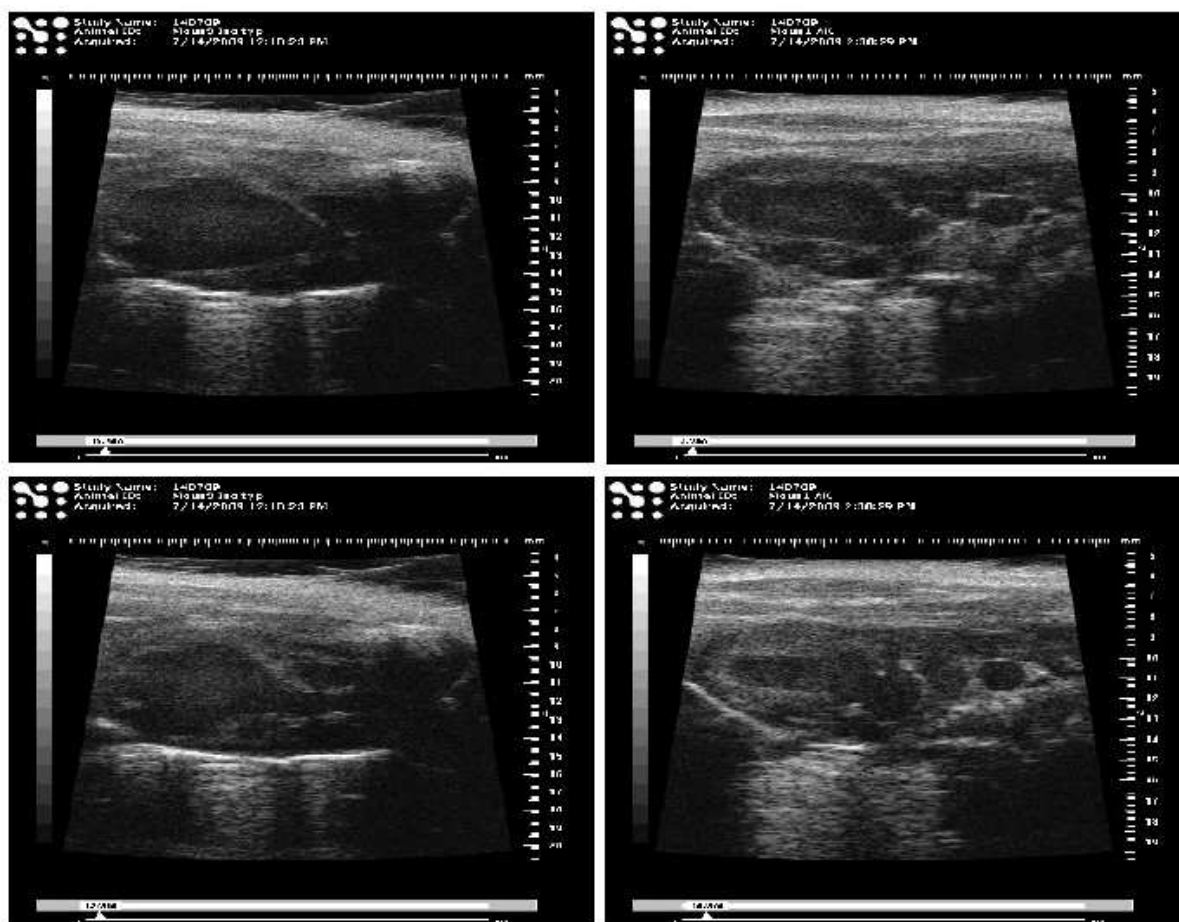
Maus	Behandlung mit CD147-	Alter bei Operation	Körpergewicht der Maus	Gewicht Herz
Maus 1	Antikörper	15 Wochen	28,8g	0,12g
Maus 2	Antikörper	15 Wochen	29,2g	0,11g
Maus 3	Antikörper	12 Wochen	22,8g	0,11g
Maus 4	Antikörper	12 Wochen	23,7g	0,11g
Maus 5	Antikörper	12 Wochen	20,4g	0,16g
Maus 1	Isotyp	15 Wochen	29,2g	0,18g
Maus 2	Isotyp	15 Wochen	26,3g	0,12g
Maus 3	Isotyp	15 Wochen	25,9g	0,15g
Maus 4	Isotyp	15 Wochen	24,8g	0,13g

3.3.6.1. Echokardiographie

Die echokardiographische Untersuchung dient unter anderem zur Messung der endsystolischen und enddiastolischen Ventrikelfläche und der daraus resultierenden linksventrikulären fraktionellen Faserverkürzung (FAC: fractional area change). Letztere dient zur Quantifizierung einer möglicherweise eingeschränkten Herzpumpfunktion.

Die sonographische Untersuchung wurde jeweils am siebten Tag nach myokardialer Ischämie/Reperfusion durchgeführt (siehe Abb.39).

Pro Tier wurden drei unterschiedliche Einstellungen gewählt, woraus das arithmetische Mittel berechnet wurde (siehe Tab.9).



Isotypkontrolle

anti-CD147-Antikörper

Abb.39: Die Herzfunktion einer mit anti-CD147-Antikörper behandelten Maus ist sieben Tage nach Operation weniger stark eingeschränkt.

Echokardiographische Darstellung der Herzfunktion im Längsschnitt in der Diastole (oben) und in der Systole (unten).

Tab.9: Darstellung der FAC-Einzelwerte aus Versuchsnummer 4

FAC – „fractional area change“; MW - arithmetischer Mittelwert; SEM - Standardfehler

	CD147-Isotyp				anti-CD147-Antikörper				
	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 4	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 4	Maus 5
FAC	19,08%	19,94%	26,58%	27,34%	58%	50,69%	69,83%	29,88%	53,04%

Für das FAC ergeben sich im Mittel folgende Werte:

- C57Bl/6J, behandelt mit anti-CD147-Antikörper: $52,29\% \pm 6,5\%$
- C57Bl/6J, behandelt mit CD147-Isotyp: $23,23\% \pm 2,16\%$.

Demnach ist die Kontraktionskraft des Herzens nach myokardialer Ischämie/Reperfusion und Behandlung mit CD147-Isotyp gegenüber anti-CD147-Antikörper signifikant verschlechtert (siehe Abb.40).

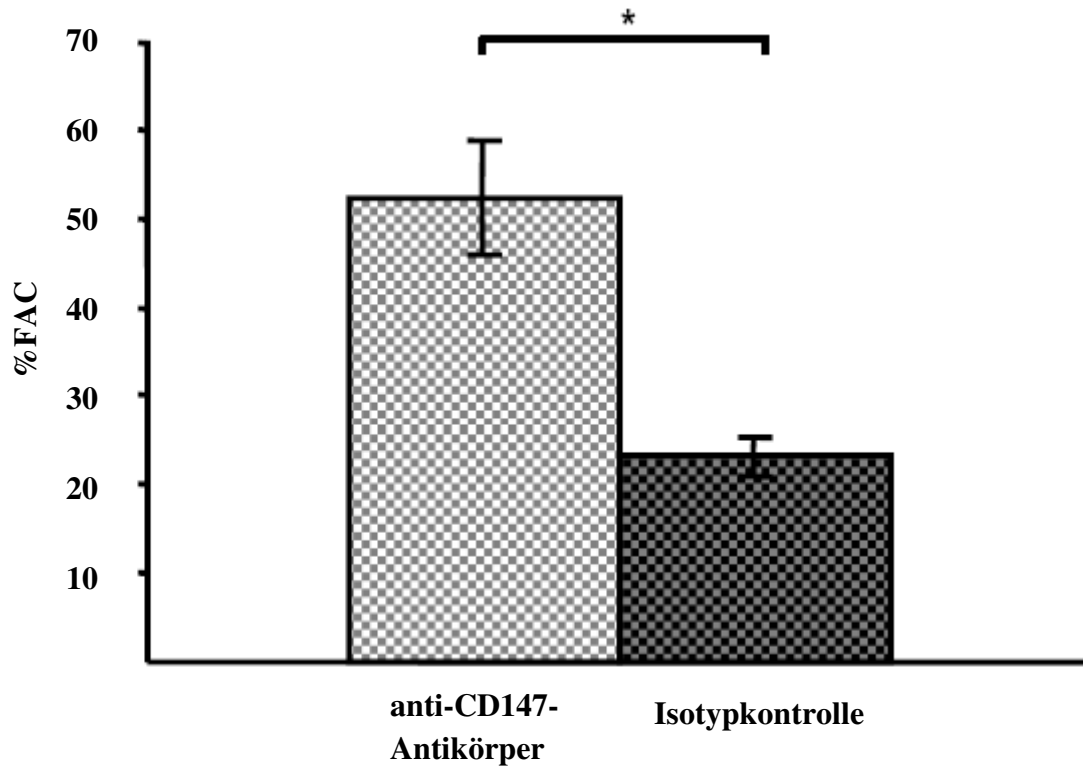


Abb.40: Mit anti-CD147-Antikörper behandelte Mäuse haben sieben Tage nach Operation eine signifikant weniger eingeschränkte Herzfunktion. Vergleichende Darstellung des FAC bei C57Bl/6J-Mäusen nach myokardialer Ischämie/Reperfusion und pharmakologischer Inhibierung von CD147.

AaR – „area at risk“; FAC – „fractional area change“; I – Infarkt; * - $p < 0,05$

3.3.6.2. Infarktgrößen

Tab.10: Einzelergebnisse der Infarktgrößenbestimmung.

AaR - „area at risk“; LV - linker Ventrikel; I - Infarkt

Maus	Behandlung mit CD147-	%AaR/LV	%I/LV	%I/AaR
Maus 1	Antikörper	60,87	21,52	34,4
Maus 2	Antikörper	30,22	6,58	30,71
Maus 3	Antikörper	28,27	2,35	11,43
Maus 4	Antikörper	42,71	17,16	43,55
Maus 5	Antikörper	57,71	11,26	21,31
Maus 1	Isotyp	63,87	41,74	54,14
Maus 2	Isotyp	41,56	19,72	56,27
Maus 3	Isotyp	33,12	14,21	39,04
Maus 4	Isotyp	68,29	34,82	50,4

Die Berechnung des prozentualen Anteils vom Infarktgebiet zur Fläche der “area at risk” erbrachte folgende Ergebnisse (%I/AaR):

- C57Bl/6J, behandelt mit anti-CD147-Antikörper: 28,28% \pm 6,84%
- C57Bl/6J, behandelt mit CD147-Isotyp: 49,96% \pm 3,84% (siehe Abb.41).

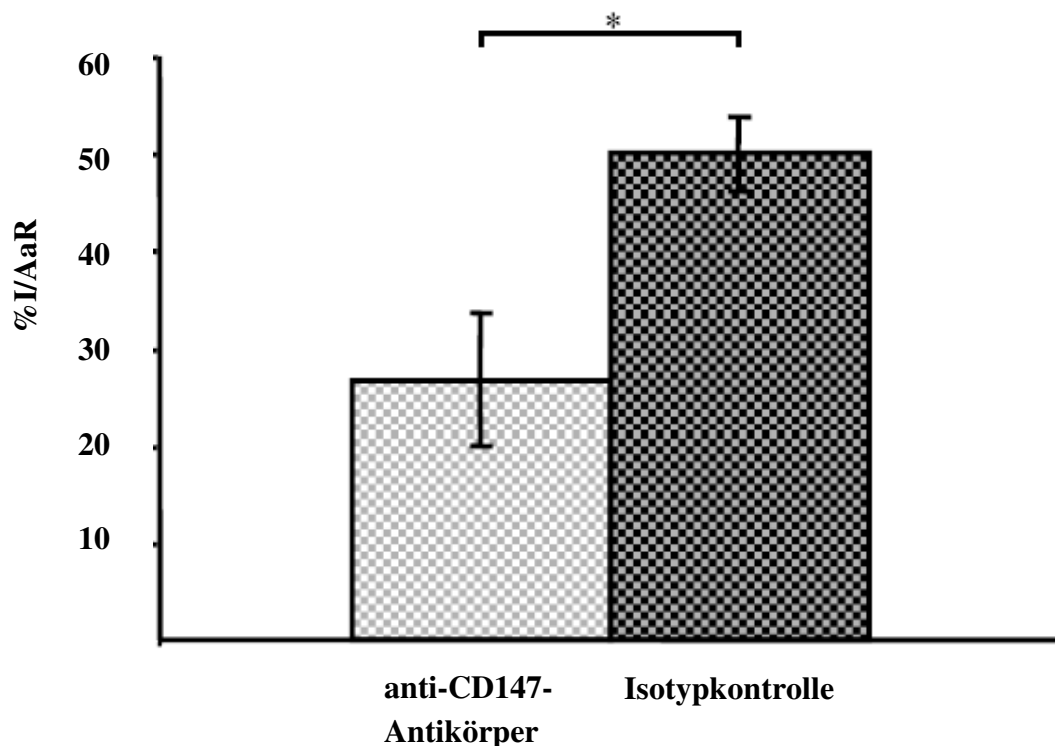


Abb.41: Mit anti-CD147-Antikörper behandelte Mäuse haben sieben Tage nach Operation ein signifikant geringeres Infarktareal.

Es wurde der mittlere Anteil des Infarktes zur Fläche der AaR ins Verhältnis gesetzt.

AaR - „area at risk“; I – Infarkt; * - $p < 0,05$

Bei Betrachtung des Verhältnisses von Größe des Infarktes und Fläche des linken Ventrikels, erhält man folgende Werte:

- C57Bl/6J, behandelt mit CD147-Antikörper: $11,77\% \pm 3,18\%$
- C57Bl/6J, behandelt mit CD147-Isotyp: $27,62\% \pm 6,41\%$ (siehe Abb.42).

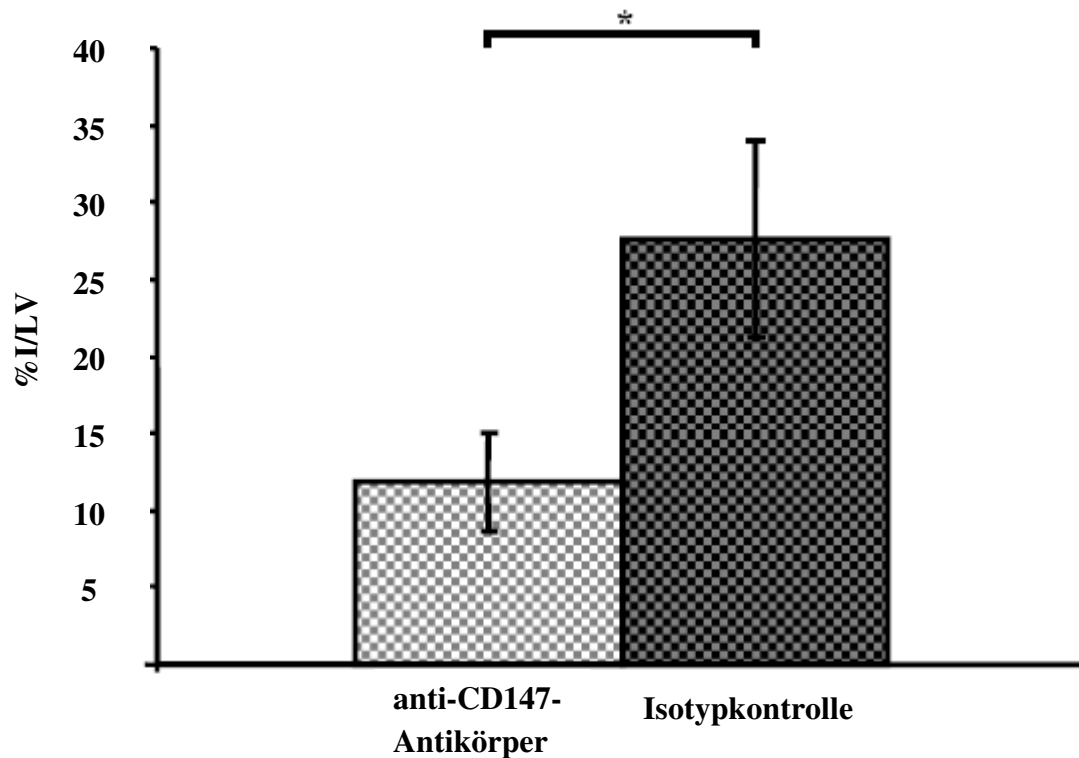


Abb.42: Der Anteil der Infarktausdehnung an der Fläche des linken Ventrikels ist sieben Tage nach myokardialer Ischämie/Reperfusion bei mit anti-CD147-Antikörper behandelten Mäusen signifikant geringer.

I – Infarkt; LV – linker Ventrikel; * - $p < 0,05$

Die mittlere Größe der „area at risk“ in Bezug zur Fläche des linken Ventrikels beträgt:

- C57Bl/6J, behandelt mit CD147-Antikörper: $43,96\% \pm 6,79\%$
- C57Bl/6J, behandelt mit CD147-Isotyp: $54,21\% \pm 9,96\%$ (siehe Abb.43).

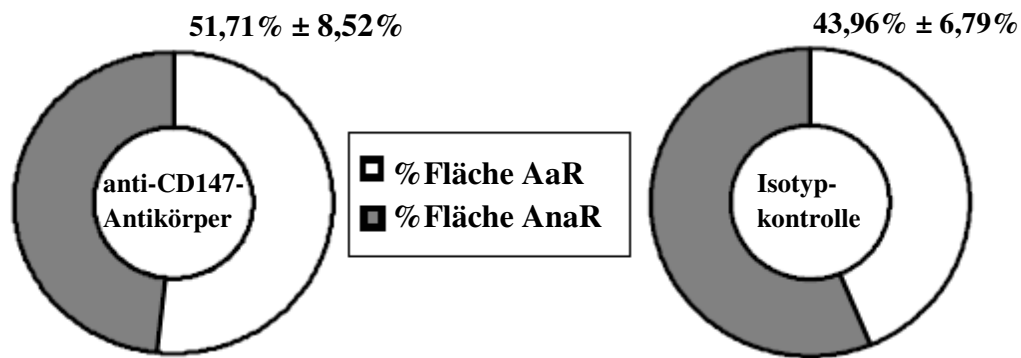


Abb.43: Die Areale der ischämischen Bereiche sind bei Versuchs- und Kontrollgruppe nicht signifikant unterschiedlich.

Arithmetische Mittel der „area at risk“ bei C57Bl/6J-Mäusen, die mit CD147-Antikörper oder –Isotyp behandelt wurden,
AaR – „area at risk“; AnaR – „area non at risk“

Während die Infarktflächen der mit CD147-Antikörper behandelten Mäuse im Verhältnis zur „area at risk“ und linkem Ventrikel signifikant verringert sind, weisen die Ausdehnungen der „area at risk“ bei Versuchs- und Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede auf. Bei dieser Versuchsgruppe ist der Vergleich %I/AaR repräsentativer als die Berechnung des Verhältnisses %I/LV. Die verschiedenen großen Ausdehnungen der „area at risk“ können durch abweichende Verläufe der linken Koronararterien entstehen.

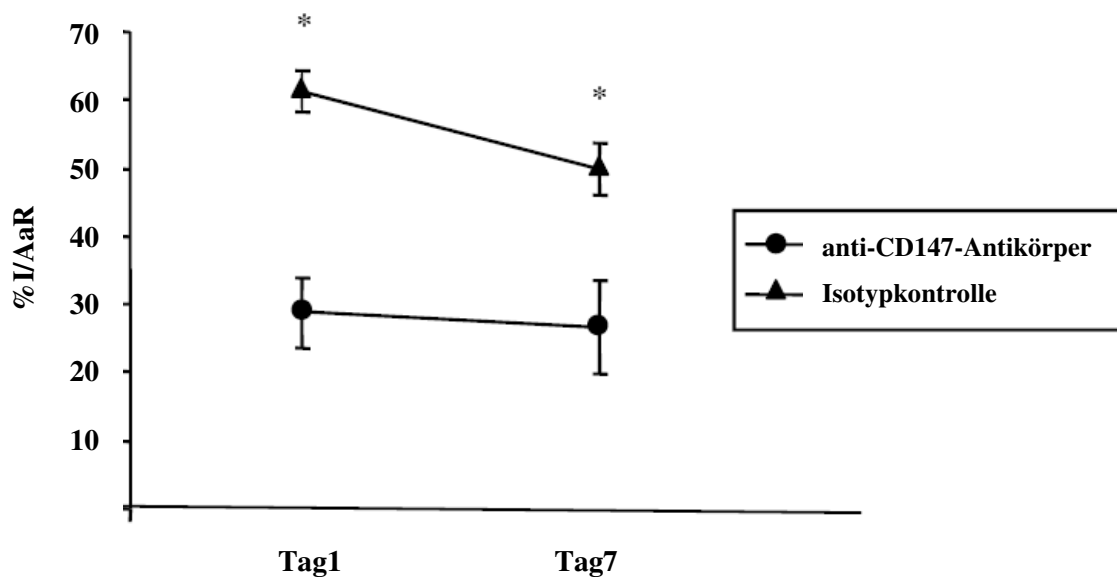


Abb.44: Mit längerer Dauer der Reperfusion bleiben die Infarktareale der Antikörper-behandelten Mäuse nahezu unverändert, wohingegen sich die Infarktflächen der Isotypkontrollen verringern.

Gegenüberstellung der prozentualen Infarktgrößen an der jeweiligen „area at risk“ nach 24 Stunden sowie sieben Tagen Reperfuptionszeitraum.

AaR – „area at risk“; I – Infarkt; * - p<0,05

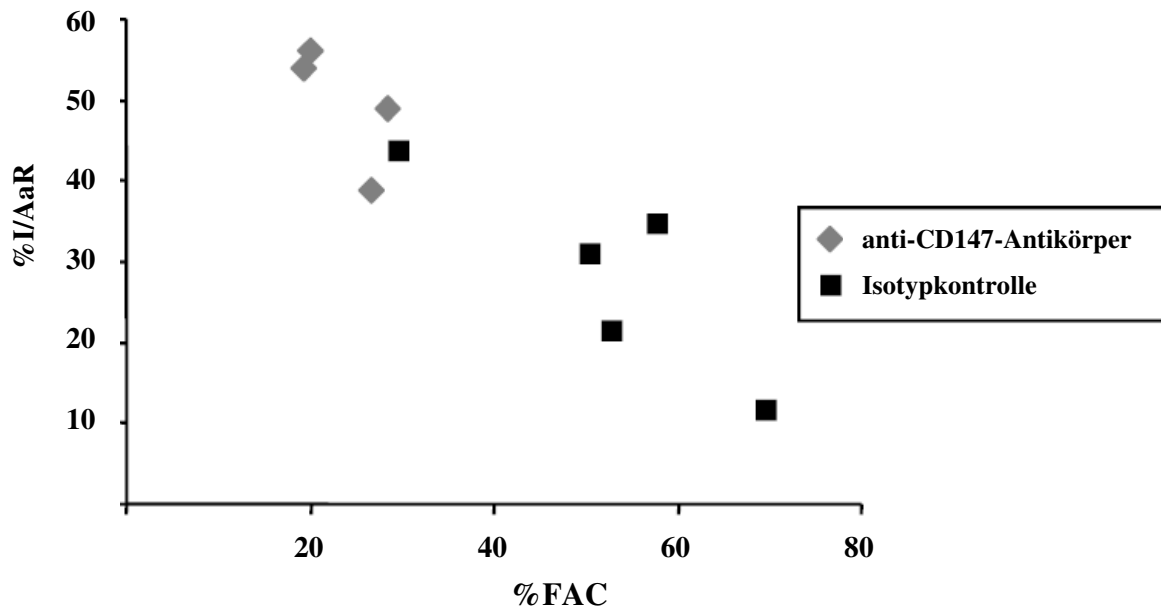
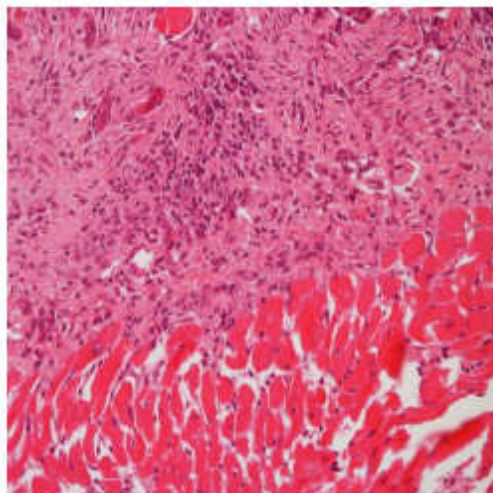


Abb.45: Mit abnehmender Infarktgröße (%I/AaR) verbessert sich das FAC und somit die Kontraktionskraft des Herzens.

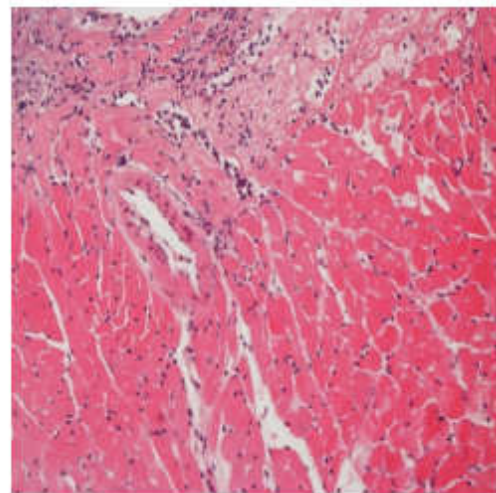
Korrelation zwischen Infarktgröße (%I/AaR) und FAC.

AaR – „area at risk“; FAC – „fractional area change“; I - Infarkt

3.3.6.3. HE-Färbung



Isotypkontrolle



anti-CD147-Antikörper

Abb.46: Bei den mit anti-CD147-Antikörper behandelten Mäusen ist sieben Tage nach Operation eine verminderte Dichte an Zellkernen, die sich im Infarktgebiet befinden, erkennbar.

Exemplarische Darstellung der Infarkttrandzonen von C57Bl/6J-Mäusen nach myokardialer Ischämie/Reperfusion sowie Behandlung mit anti-CD147-Antikörper oder der Isotypkontrolle.

3.3.7. Versuchsnummer 5

Hierbei handelt es sich um sechs CypA^{-/-}-Mäuse, die einer myokardialen Ischämie/Reperfusion unterzogen und 24 Stunden später euthanasiert wurden, um die Infarktgröße zu bestimmen (siehe Tab.11). Die Kontrollgruppe – bestehend aus neun CypA^{+/+}-Mäusen – erhielt dieselbe Behandlung.

3.3.7.1. Infarktgrößen

Das berechnete Infarktareal (I) wird prozentual zur Fläche des linken Ventrikels (LV) und zum ischämischen Gebiet (AaR) ins Verhältnis gesetzt.

Tab.11: Allgemeine Daten der Versuchsnummer 5 sowie Einzelergebnisse der myokardialen Ischämie/Reperfusion.

AaR – „area at risk“; I – Infarkt; LV – linker Ventrikel

Maus	Alter bei Operation	Gewicht Herz	%AaR/LV	%I/LV	%I/AaR
CypA ^{-/-} 94	15 Wochen	0,076	76,85	10,45	12,63
CypA ^{-/-} 3	14 Wochen	0,082	56,25	16,01	35,41
CypA ^{-/-} 4	14 Wochen	0,095	47,13	13,07	24,84
CypA ^{-/-} 5	14 Wochen	0,077	66,68	13,77	21,02
CypA ^{-/-} 54	12 Wochen	0,088	54,67	13,51	25,47
CypA ^{-/-} 26	14 Wochen	0,084	70,07	20,73	25,25
CypA ^{+/+} 21	16 Wochen	0,11	81,09	25,77	30,78
CypA ^{+/+} 32	18 Wochen	0,089	79,83	13,55	18,04
CypA ^{+/+} 34	18 Wochen	0,084	65,61	28,76	44,38
CypA ^{+/+} 35	18 Wochen	0,1	73,22	24,62	34,8
CypA ^{+/+} 39	18 Wochen	0,12	78,08	62,07	81,08
CypA ^{+/+} 18	16 Wochen	0,092	41,3	13,01	40,48
CypA ^{+/+} 19	16 Wochen	0,1	60,74	32,89	52,01
CypA ^{+/+} 20	16 Wochen	0,102	51,58	31,79	58,65
CypA ^{+/+} 21	16 Wochen	0,087	79,61	69,33	87,37

Der Anteil des Infarktes am Ischämiegebiet beträgt (%I/AaR):

- CypA^{-/-}: 24,1% ± 3,02%
- CypA^{+/+}: 49,73% ± 7,62% (siehe Abb.47).

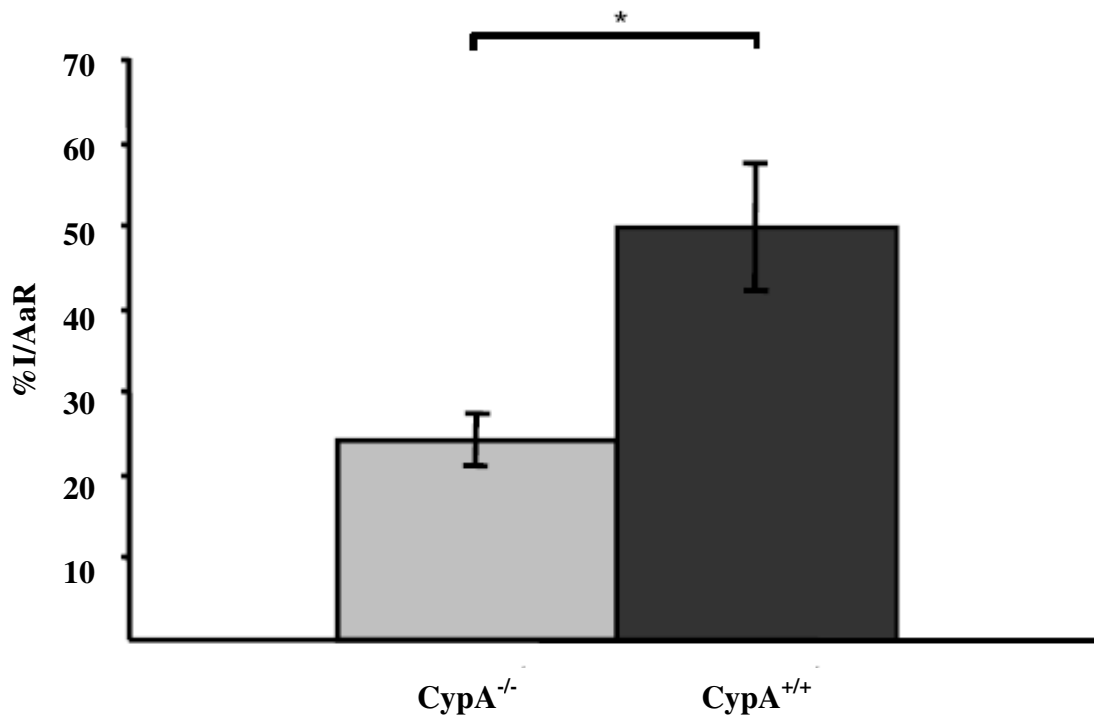


Abb.47: Bezogen auf das Ischämiegebiet ist die Infarktgröße der CypA^{-/-}Maus signifikant verringert.

Die Auswertung der Infarktareale erfolgte 24 Stunden nach myokardialer Ischämie/Reperfusion.

AaR – „area at risk“; I – Infarkt; * - p<0,05

Für den linken Ventrikel ergibt sich folgender Infarktanteil:

- CypA^{-/-}: 14,59% ± 1,43%
- CypA^{+/+}: 33,53% ± 6,54% (siehe Abb.48).

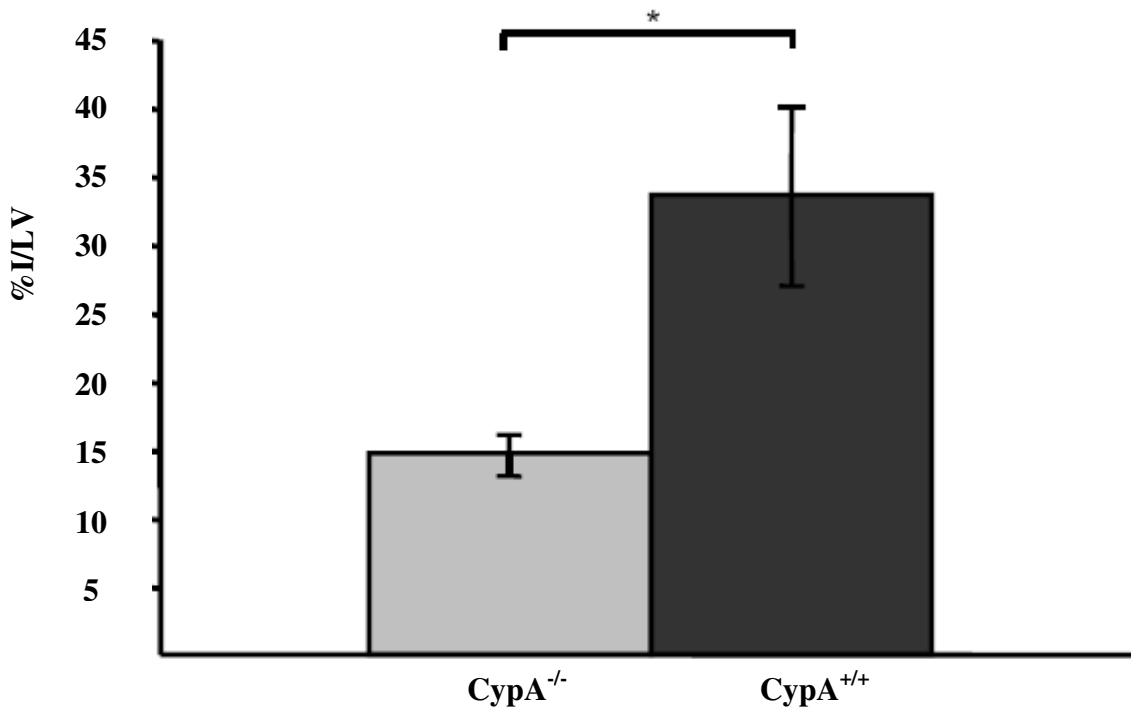


Abb.48: Die Infarktgröße im Verhältnis zum linken Ventrikel ist bei der CypA^{-/-}Maus signifikant vermindert.

Bestimmung des Infarktanteils 24 Stunden nach myokardialer Ischämie/Reperfusion.

I – Infarkt; LV – linker Ventrikel; * - p<0,05

Wird der Anteil der „area at risk“ zur Größe des linken Ventrikels ins Verhältnis gesetzt, ergibt sich ein arithmetisches Mittel von (%AaR/LV):

- CypA^{-/-}: 61,94% ± 4,53%

- CypA^{+/+}: 67,9% ± 4,74%.

Somit besteht zwischen den Mittelwerten der „area at risk“ von Versuchs- und Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied (siehe Abb.49).

Ähnliche Flächenausdehnungen der „area at risk“ im Verhältnis zum linken Ventrikel deuten auf eine hohe Standardisierung der Operationstechnik hin.

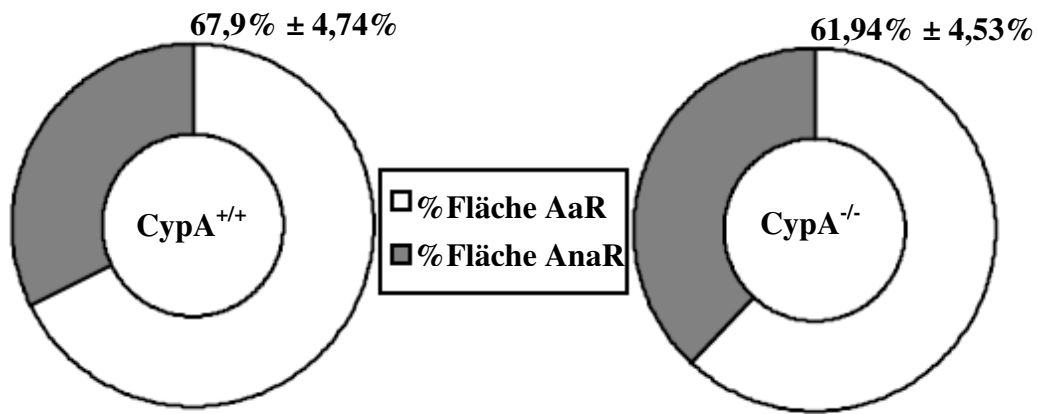


Abb.49: Die jeweiligen Ischämiegebiete sind bei CypA^{-/-}Mäusen und der Kontrollgruppe nicht signifikant abweichend.

Bestimmung der „area at risk“ bezogen auf die Fläche des linken Ventrikels 24 Stunden nach myokardialer Ischämie/Reperfusion.

AaR – „area at risk“; AnaR – „area non at risk“

3.3.7.2. HE-Färbung

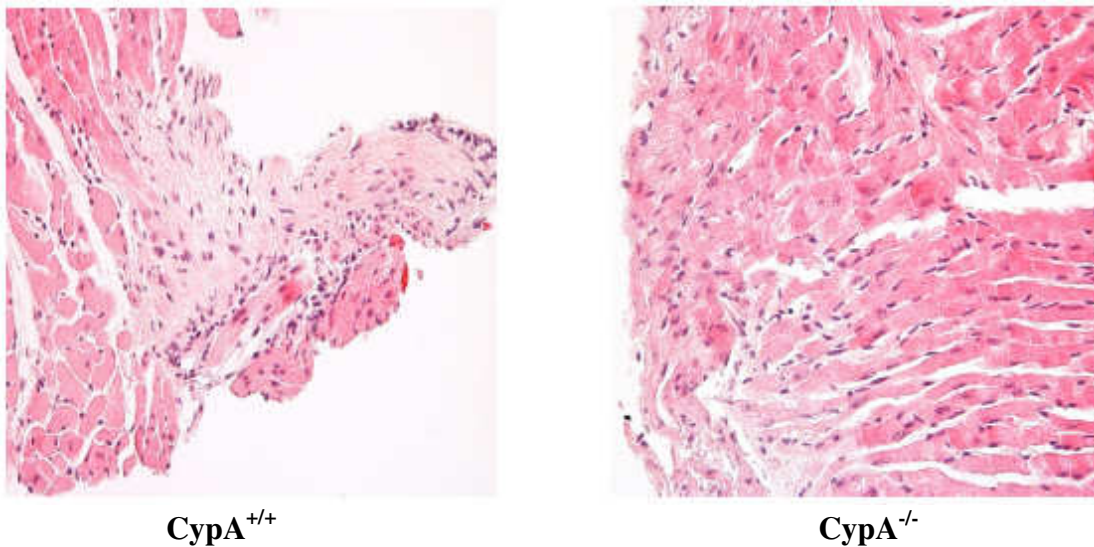


Abb.50: Neben einer deutlich kleineren Infarktnarbe ist bei den CypA^{-/-}Mäusen eine geringere Dichte an Zellkernen im Infarktgebiet erkennbar.

24 Stunden nach myokardialer Ischämie und Reperfusion wurden die Mäuse euthanasiert und das Herzgewebe für die histologische Untersuchung und HE-Färbung aufbereitet.

3.3.8. Versuchsnummer 6

Bei fünf CypA^{-/-}Mäusen wurde chirurgisch eine myokardiale Ischämie/Reperfusion erzeugt. Am Tag sieben erfolgte eine echokardiographische Untersuchung und anschließend die Euthanasie der Tiere und Infarktgrößenbestimmung (siehe Tab.12).

Die aus sechs CypA^{+/+}Mäusen bestehende Kontrollgruppe wurde identisch behandelt.

Tab.12: Allgemeine Daten der Versuchsnummer 6

Maus	Alter bei Operation	Körpergewicht der Maus	Gewicht Herz
CypA ^{-/-} 48	15 Wochen	24,1g	0,099g
CypA ^{-/-} 68	12 Wochen	20,8g	0,088g
CypA ^{-/-} 49	13 Wochen	18,5g	0,072g
CypA ^{-/-} 50	13 Wochen	17,8g	0,07g
CypA ^{-/-} 75	12 Wochen	23,9g	0,071g
CypA ^{+/+} 59	12 Wochen	24,7g	0,109g
CypA ^{+/+} 61	12 Wochen	25g	0,1g
CypA ^{+/+} 62	12 Wochen	24,8g	0,095g
CypA ^{+/+} 52	13 Wochen	24g	0,099g
CypA ^{+/+} 53	13 Wochen	24,7g	0,1g
CypA ^{+/+} 31	12 Wochen	25,9g	0,127g

3.3.8.1. Echokardiographie

Die Bestimmung der linksventrikulären Verkürzungsfraction (FAC – „fractional area change“) dient der Quantifizierung einer möglichen Funktionsstörung des Herzens nach myokardialer Ischämie/Reperfusion. Das FAC wird durch planimetrische Ausmessung der enddiastolischen und endsystolischen Flächen des linken Ventrikels errechnet (siehe Abb.51). Die sonographische Untersuchung der Gruppe 6 erfolgte sieben Tage nach myokardialer Ischämie/Reperfusion (siehe Tab.13).

Aufgrund von Tachykardie und dem häufigen Auftreten von Extrasystolen war die echokardiographische Auswertung der Maus CypA^{+/+} 31 nicht möglich.

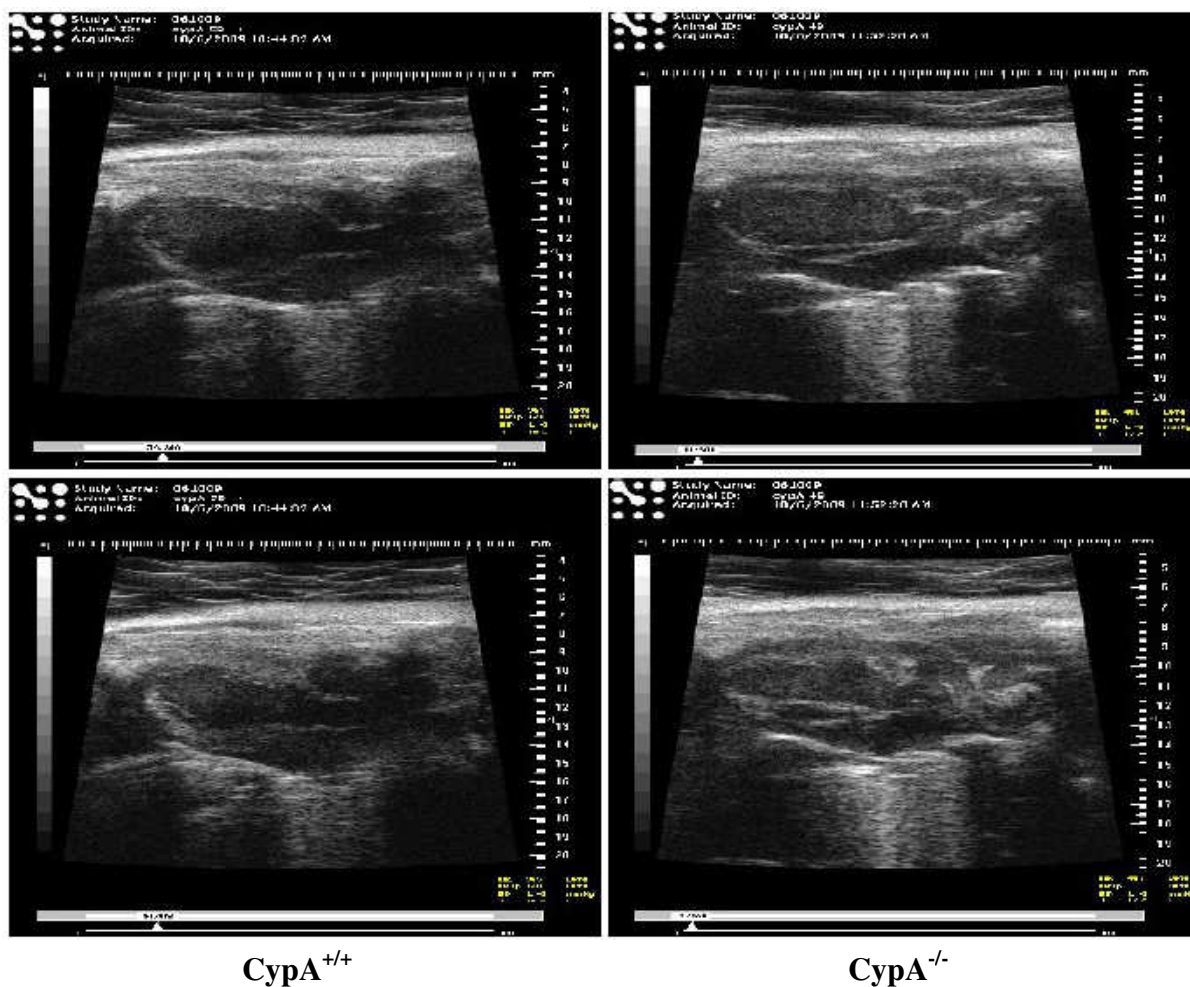


Abb.51: Die linksventrikuläre Verkürzungsfraction ist bei $CypA^{-/-}$ Mäusen sieben Tage nach myokardialer Ischämie/Reperfusion weniger stark beeinträchtigt. Echokardiographische Darstellung der Herzlängsachsen in der Diastole (obere Reihe) und in der Systole (untere Reihe).

Tab.13: arithmetische Mittel des FAC.

Planimetrisch werden aus den echokardiographischen Aufnahmen die enddiastolischen sowie endsystolischen Flächen der Längsachse ermittelt. Aus diesen Werten wird für jede Maus der Mittelwert des FAC berechnet.
FAC – „fractional area change“

	$CypA^{-/-}$					$CypA^{+/+}$					
Maus	48	68	49	50	75	59	61	62	52	53	31
%FAC	28,93	74,39	39,02	40,46	39,2	35,43	26,73	20,95	24,21	22,93	-

ERGEBNISSE

Das arithmetische Mittel des FAC dieser Versuchsgruppe beträgt:

- bei $\text{CypA}^{-/-}$: $44,4\% \pm 7,78\%$
- bei $\text{CypA}^{+/+}$: $26,05\% \pm 2,53\%$ (siehe Abb.52).

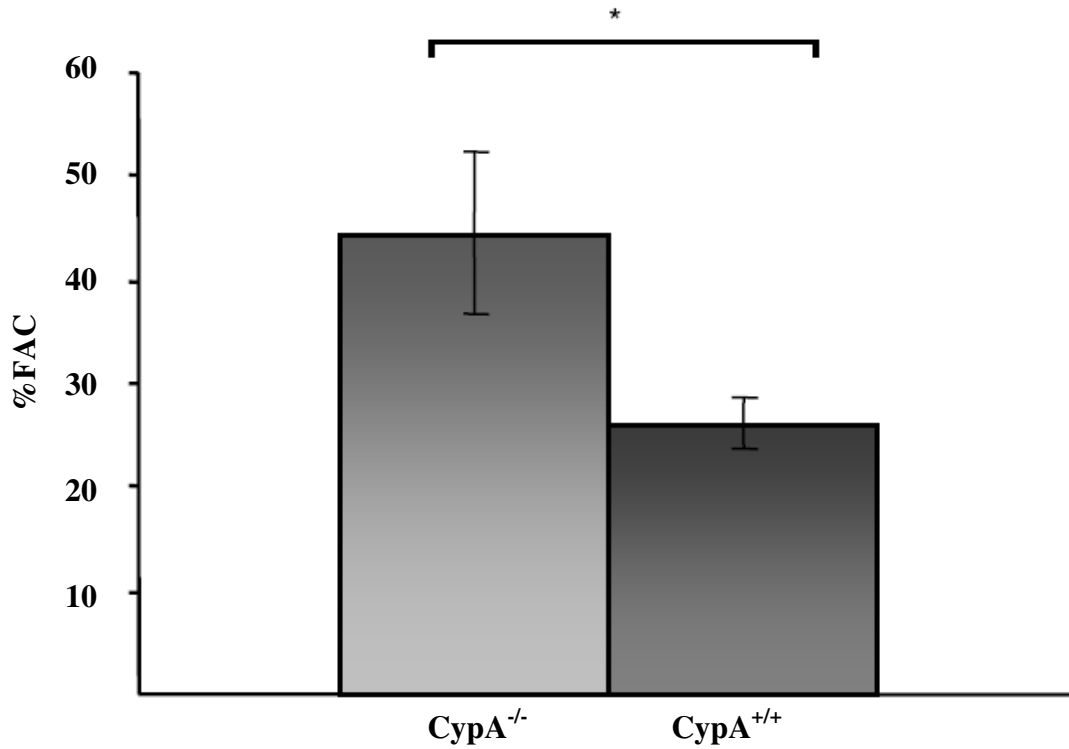


Abb.52: Die Herzfunktion der $\text{CypA}^{-/-}$ -Mäuse ist sieben Tage nach myokardialer Ischämie/Reperfusion gegenüber der Kontrollgruppe signifikant weniger eingeschränkt. FAC – „fractional area change“; * - $p < 0,05$

3.3.8.2. Infarktgrößen

Tab.14: Einzelwerte der Infarktgrößenbestimmung.

AaR – „area at risk; I – Infarkt; LV – linker Ventrikel

Maus	%AaR/LV	%I/LV	%I/AaR
CypA ^{-/-} 48	37,6	7,01	18,24
CypA ^{-/-} 68	38,58	11,35	14,25
CypA ^{-/-} 49	39,71	6,27	40,44
CypA ^{-/-} 50	50,53	7,55	38,45
CypA ^{-/-} 75	45,77	4,08	37,49
CypA ^{+/+} 59	49,01	37,93	76,5
CypA ^{+/+} 61	56,21	28,29	50,05
CypA ^{+/+} 62	46,37	25,19	54,72
CypA ^{+/+} 52	45,77	15,34	37,24
CypA ^{+/+} 53	56,65	27,97	48,49
CypA ^{+/+} 31	41,47	24,7	59,57

Bezogen auf die „area at risk“ beträgt die Infarktfläche (%I/AaR):

- bei CypA^{-/-}: 29,77% ± 5,58%
- bei CypA^{+/+}: 54,43% ± 5,37% (siehe Abb.53).

Verglichen mit Versuchsnummer 5 (siehe Abb.47) ergeben sich keine Unterschiede der Infarktgrößen zwischen 24 Stunden und sieben Tagen nach myokardialer Ischämie/Reperfusion.

Mit zunehmendem Anteil der Infarktfläche an der „area at risk“ (%I/AaR) verschlechtert sich die linksventrikuläre Verkürzungsfraktion (FAC).

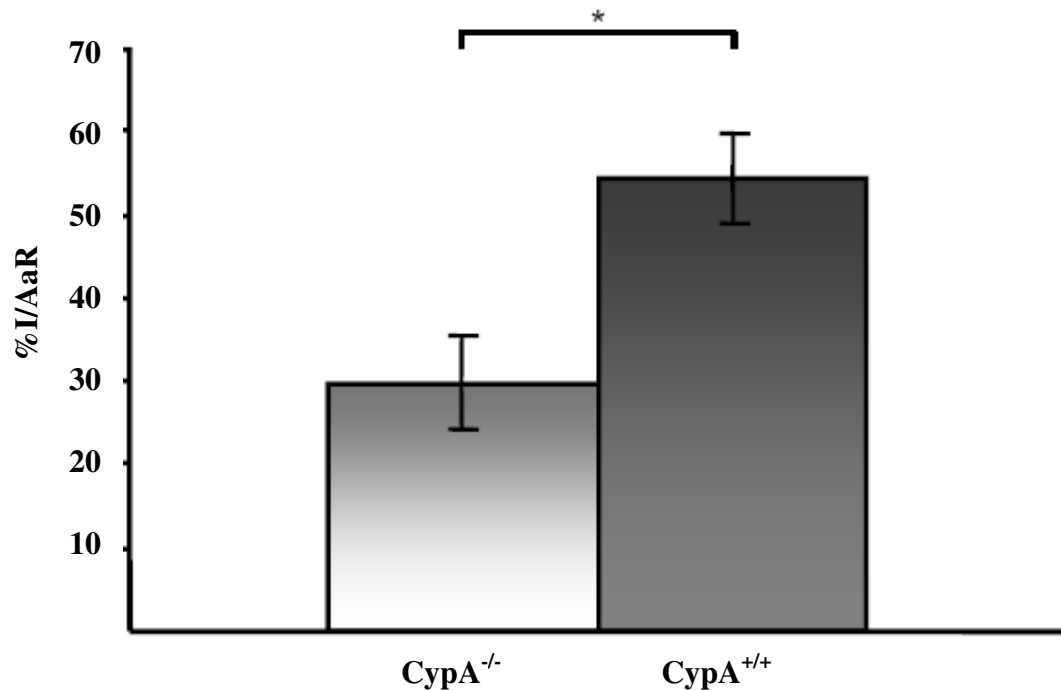


Abb.53: Die Infarktfläche im Verhältnis zur „area at risk“ ist bei CypA^{-/-}Mäusen signifikant verringert.

Die Bestimmung der Infarktgrößen erfolgte sieben Tage nach myokardialer Ischämie/Reperfusion.

AaR – „area at risk“; I – Infarkt; * - $p < 0,05$

Wird der Anteil des Infarktes auf die Fläche des linken Ventrikels berechnet, ergeben sich folgende Werte (%I/LV):

- bei CypA^{-/-}: $7,25\% \pm 1,18\%$
- bei CypA^{+/+}: $26,57\% \pm 2,97\%$ (siehe Abb.54).

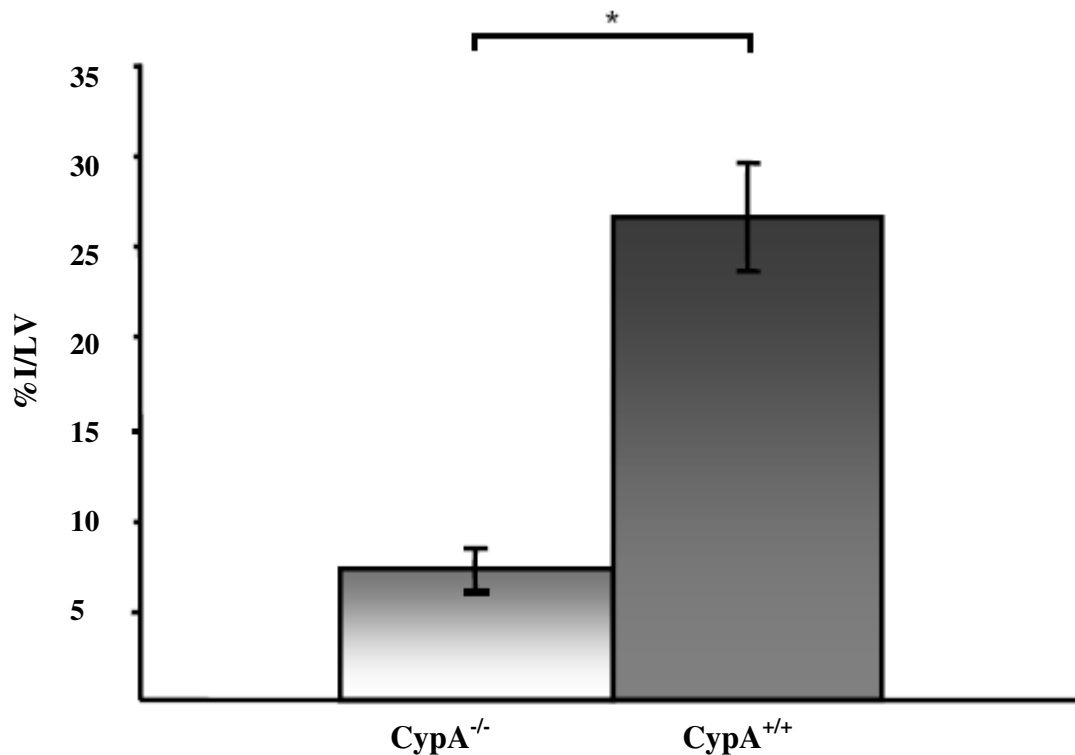


Abb.54: Bezogen auf die Fläche des linken Ventrikels ist das Infarktareal bei CypA^{-/-} Mäusen signifikant verringert.

Die Berechnung der Infarktgrößen erfolgte sieben Tage nach myokardialer Ischämie/Reperfusion.

I – Infarkt; LV – linker Ventrikel; * - $p < 0,05$

Das Verhältnis zwischen „area at risk“ und Fläche des linken Ventrikels beträgt:

- bei CypA^{-/-}: $42,44\% \pm 2,47\%$
- bei CypA^{+/+}: $49,25\% \pm 2,48\%$

Die Anteile der „area at risk“ an der Fläche des linken Ventrikels ergeben zwischen CypA^{-/-} Mäusen und der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied (siehe Abb.55).

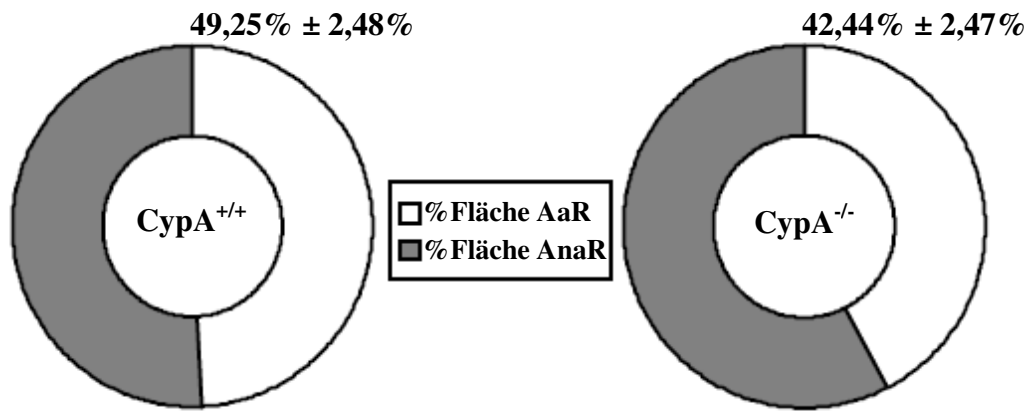


Abb.55: Die prozentualen Anteile der „area at risk“ am linken Ventrikel sind zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe nicht signifikant unterschiedlich.

Berechnung sieben Tage nach myokardialer Ischämie/Reperfusion.

AaR – „area at risk“; AnaR – „area non at risk“

3.3.8.3. HE-Färbung

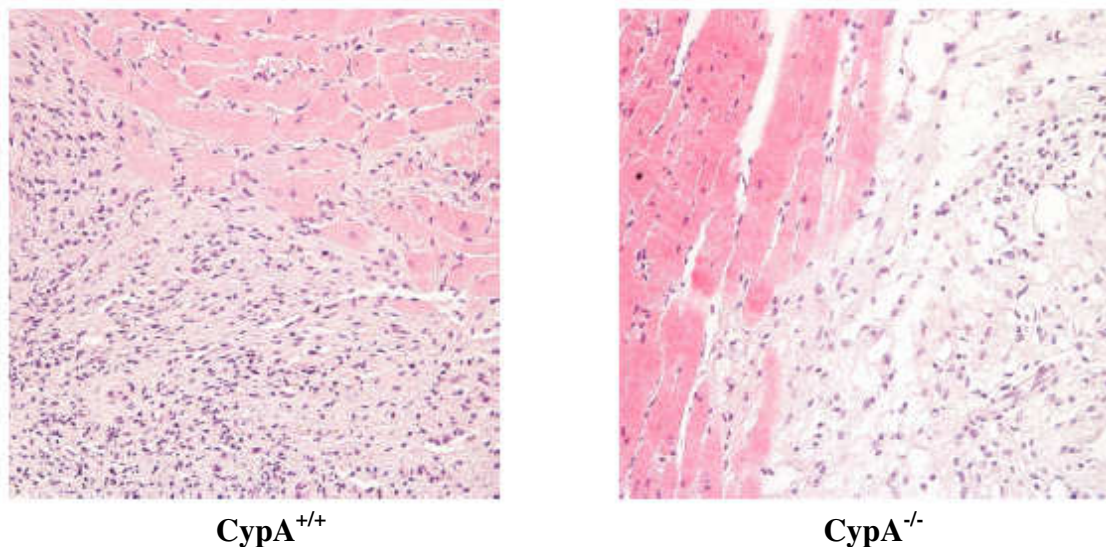


Abb.56: Die Dichte an Zellkernen ist bei CypA^{-/-}Mäusen geringer als bei der Wildtypkontrolle.

Darstellung der Infarkttrandzonen sieben Tage nach myokardialer Ischämie/Reperfusion in der HE-Färbung.

4. DISKUSSION

Ziel dieser Studie ist es, Reparaturprozesse infolge eines akuten Myokardinfarktes zu begreifen und therapeutisch zu beeinflussen. Dabei spielen zelluläre Entzündungsvorgänge im Infarktgebiet eine wichtige Rolle.

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit besagt, dass das CD147-CypA-System großen Anteil an der Initiierung dieser Entzündungsprozesse hat.

Zum einen wird intrazelluläres CypA als Folge inflammatorischer Signale von den Zellen sezerniert. *In vitro* konnte auf Myozyten eine erhöhte Sekretion von CypA nach Hypoxie und Reperfusion nachgewiesen werden (SEKO Y et al 2004). In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe erfolgten immunhistochemische Untersuchungen von humanen Herzbiopsien nach einem akuten Infarkt. Dabei konnte eine erhöhte Expression von CD147 auf Kardiomyozyten festgestellt werden. Außerdem wurde CypA auf infiltrierenden Leukozyten sowie Makrophagen vermehrt dargestellt (SEIZER P et al., in Vorbereitung). Durch die Bindung von CypA an CD147 wird die Entzündung vor allem über die Induktion von Zytokinen und Chemotaxis der Entzündungszellen gefördert. Zudem führt auf Thrombozyten befindliches CD147 über eine Thrombozyten-Monozyten-Interaktion zur Synthese von Zytokinen in Monozyten (SCHMIDT R et al. 2008).

Zum anderen veranlasst CD147 die Produktion von MMP2 und 9 auf Fibroblasten und glatten Muskelzellen. Aktivierte MMPs bauen entsprechend ihrer Substratspezifität Bestandteile der Extrazellulären Matrix ab. Wir vermuten, dass MMPs somit eine wichtige Rolle in den Remodelingprozessen nach Myokardinfarkt spielen.

In Vorarbeiten konnte bereits der Einfluss von CD147 auf die MMP-Regulation in atherosklerotischen Prozessen dargestellt werden (SCHMIDT R et al. 2007; SCHMIDT R et al. 2006). Zudem konnte eine verstärkte Expression von CD147 auf Monozyten nach dem humanen Myokardinfarkt nachgewiesen werden (SCHMIDT R et al. 2006). Des Weiteren gibt es eine Vielzahl von Publikationen, die die Rolle von MMPs auf die Remodelingvorgänge nach Myokardinfarkt beleuchten (SCHMIDT R et al. 2006; VANHOUTTE et al. 2006; MATSUMURA S et al. 2005; ROMANIC AM et al. 2002).

Bisher wurde jedoch nicht der Einfluss von CD147 auf die CypA-vermittelte Migration von Entzündungszellen bzw. auf die MMP-Expression nach myokardialer Ischämie/Reperfusion untersucht. Durch das murine Modell der myokardialen Ischämie und Reperfusion ist es möglich diese Zusammenhänge auch *in vivo* sichtbar zu machen.

4.1. Zur Eignung des Maus-Myokardinfarktmodells

4.1.1. Die Maus als Versuchstier

Mit der Entwicklung von transgenen und Knockout-Mäusen ist der Anteil der Mäuse bei Tierversuchen stark angestiegen. Zudem bietet dieses Versuchstier die Vorteile leichten Handlings, geringen Platzbedarfs, kostengünstiger Haltung und Ernährung sowie geringem Medikamentenverbrauchs. Die Zucht der Mäuse wird durch kurze Tragezeiten und Größe der Würfe erleichtert. Anatomisch besitzen die Herzen von Mensch und Maus im Aufbau der Ventrikel und im Verlauf der Koronargefäße viele Gemeinsamkeiten. Somit wurde das Schwein, welches dem Verhältnis Herz zu Körpergewicht dem des Menschen am ehesten entspricht, fast vollständig durch Nagetiere ersetzt.

Beim Vergleich des Verlaufs der Entzündungsreaktion nach einem Myokardinfarkt bei Mäusen und größeren Säugetieren fallen Unterschiede auf. Mäuse bilden schneller Granulationsgewebe, besitzen eine geringere Mastzelldichte und eine weniger stark ausgeprägte Angiogenese. Insgesamt aber teilen die Entzündungsantworten bei Mäusen und größeren Säugetieren viele gemeinsame Kriterien, so dass das Versuchstier Maus für den Vergleich zum humanen Myokardinfarkt geeignet ist (DEWALD O et al. 2004).

Das Modell der myokardialen Ischämie/Reperfusion durch Ligatur einer Koronararterie wurde erstmals 1978 bei Mäusen durchgeführt (ZOLOTAREVA AG und KOGAN ME 1978). Inzwischen ist eine Reihe von Publikationen, die dieses Modell nutzten, erschienen. Auffallend ist die große Varianz der Infarktgrößen zwischen den Studien: Infarktareale haben eine Fläche zwischen 8% und 55% im Verhältnis zum linken Ventrikel (DU XM et al. 2000; GAO XM et al. 2000; SAM F et al. 2000). Auch innerhalb einer Studie können die ermittelten Infarktgrößen stark schwanken, so dass, basierend auf der Infarktgröße, Subgruppen gebildet werden (SAM F et al. 2000). Diese Varianzen können durch unterschiedliche Mausstämme oder verschiedene Techniken der Operation verursacht sein. Minimale Abweichungen beim Setzen der Ligatur sowie unterschiedliche Verläufe der Koronararterien können ursächlich für die Heterogenität der Infarkte innerhalb einer Gruppe sein. MICHAEL et al. unterscheiden zwei Gruppen des Verlaufs der murinen LAD (siehe Abb.57). In der ersten Gruppe verläuft die LAD als einzelnes Hauptgefäß, welches nur kleine abgehende Arterienäste besitzt. Gruppe zwei beinhaltet jene Herzen, bei denen sich die LAD alsbald in zwei ähnlich starke Arterien aufzweigt (MICHAEL LH et al. 1995). Ist daher nur ein Ast der LAD von der Ligatur betroffen, bleibt das Versorgungsgebiet des zweiten Astes von der Ischämie verschont, so dass die „area at risk“ insgesamt kleiner ausfällt.

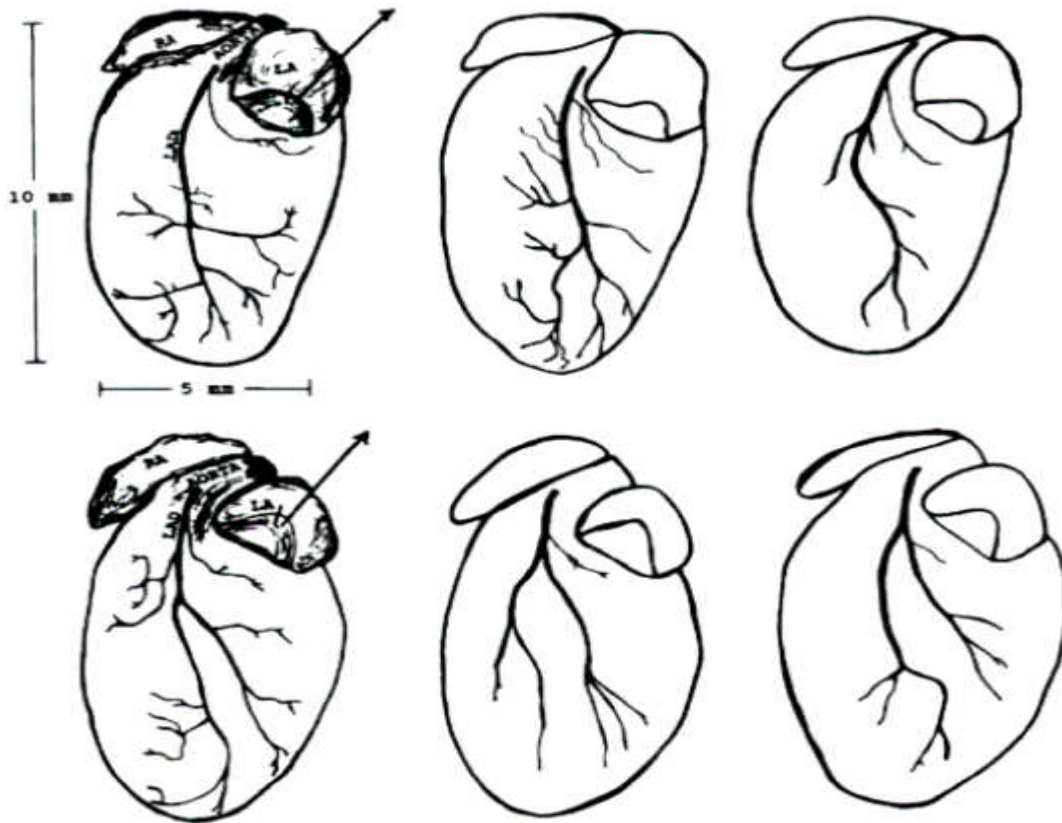


Abb.57: Mögliche Normvarianten der LAD: Während bei den oben dargestellten Herzen eine einzelne Arterie mit kleinen Abgängen vorhanden ist, verzweigt sich diese bei den unten aufgeführten Herzen in zwei Hauptäste (aus MICHAEL LH et al. 1995).

Um die Infarktgröße verschiedener Gruppen vergleichen zu können, bietet sich die Berechnung der „area at risk“ an. Diese Komponente stellt die Region dar, die potentiell vom Infarkt gefährdet ist. Wird die Infarktgröße zur Fläche der „area at risk“ ins Verhältnis gesetzt ($\%I/AaR$), können Heterogenitäten, die durch unterschiedlichen Verlauf der Koronargefäße oder durch die chirurgische Technik bedingt sind, ausgeglichen werden. Dieser Wert ist somit repräsentativer als das Verhältnis $\%I/LV$ und erlaubt den Vergleich der verschiedenen Versuchsgruppen.

Tierversuche haben eine enorme Bedeutung für das Verständnis von Remodelingprozessen nach einem akuten Myokardinfarkt. SWIRSKI et al. konnten im Mausmodell nachweisen, dass Monozyten nach Myokardinfarkt aus der Milz in das Herzgewebe migrieren. Dieser Vorgang konnte beim Myokardinfarkt einer splenektomierten Maus nicht wiederholt werden (SWIRSKI FK et al. 2009). Somit spielt nicht nur das Herzgewebe beim Remodeling eine wichtige Rolle sondern der gesamte Organismus. Diese komplexen Reparaturvorgänge sind *in vitro* nicht nachvollziehbar und können nur direkt am Herzen untersucht werden. Da auch ein explantiertes Herz nicht die Komplexität des Organismus widerspiegeln kann, scheidet diese Untersuchung aus. Somit bleibt der *in vivo*-Versuch des Myokardinfarktes an der Maus, der dem humanen System stark ähnelt. Des Weiteren bietet ein solcher Tierversuch vielfältige Auswertungsmöglichkeiten, wie Echokardiographie, hämodynamische Untersuchungen, Histologie und Zymographie.

4.1.2. Das Modell der myokardialen Ischämie/Reperfusion

Ein Myokardinfarkt entsteht zumeist infolge der Thrombose eines Koronargefäßes, wodurch das betroffene Myokard ischämisch wird. Die Folge sind Nekrosen mit Remodelingprozessen sowie Einschränkungen der Herzfunktion. Diese komplexen Vorgänge können nur eingeschränkt an einzelnen Zellen oder isolierten Langendorff-Hezen imitiert werden. Daher wurden Tiermodelle entwickelt, um die Pathophysiologie eines Myokardinfarktes zu klären und Therapieansätze zur Verringerung dieser Spätkomplikationen zu finden. Jedoch können auch im Tiermodell nicht alle beeinflussenden Faktoren berücksichtigt werden. Zum einen können Risikofaktoren für einen Myokardinfarkt, wie Nikotinabusus, Bewegungsmangel oder Diabetes mellitus nur bedingt in eine Studie integriert werden. Zum anderen kann die Pathogenese eines Myokardinfarktes chirurgisch nicht korrekt imitiert werden. Sowohl bei der Okklusion durch Ligatur, als auch durch Kryotechnik erfolgt die Einwirkung von außen. Somit wird die dem Infarkt vorausgehende Pathophysiologie der Plaque- und Thrombenbildung nicht nachgeahmt. Nebeneffekte, wie ein bereits atherosklerotisch eingengtes Gefäßlumen werden nicht berücksichtigt. Diese Vorgänge können jedoch auch Einfluss auf die Reparaturprozesse haben.

In dieser Studie wurde eine Ischämiedauer von 30 Minuten mit anschließendem Reperusionszeitraum von 24 Stunden bzw. sieben Tagen gewählt. MICHAEL et al. konnten darstellen, dass sich der Anteil des Infarkts an der „area at risk“ durch Wiederherstellung des Blutflusses nach Ischämie verringert. Während die Infarktgröße nach permanenter 24stündiger Okklusion 68,6% beträgt, verringert sie sich bei einer einstündigen Ischämie mit nachfolgender Reperfusion auf 44,5%. Beträgt die Ischämiedauer 30 Minuten sinkt die Größe des Infarkts um weitere zehn Prozent (MICHAEL LH et al. 1995). Da zwischen 30 Minuten

und einer Stunde Ischämie nur geringe Unterschiede bezüglich der entstehenden Infarktgröße vorhanden sind, wurde in dieser Studie die kürzere Ischämiedauer gewählt, um die Belastung für die Versuchstiere möglichst gering zu halten.

In einem murinen Modell unilateraler cerebraler Ischämie wurden bezüglich Infarktgrößen sowie Gewebeverlusten keine signifikanten Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren festgestellt (ZHU C et al. 2007). Vorversuche der eigenen Arbeitsgruppe zu myokardialer Ischämie/Reperfusion bestätigten diese Erkenntnisse. Daher werden sowohl männliche als auch weibliche CD147^{+/-}, CypA^{-/-} und Wildtypmäuse in die Versuchsgruppen dieser Studie eingeschlossen.

Bei der Durchführung dieses chirurgischen Eingriffes ist die Standardisierung der Operation notwendig. Somit sollten Anästhesie, Analgesie, Dauer der Okklusionen, Alter und Geschlecht der Versuchstiere sowie Körpertemperaturen während der Operation übereinstimmen (MIKI T et al. 1998; JENNINGS et al. 1960). Des Weiteren hat die Lokalisation der gesetzten Ligatur einen entscheidenden Einfluss auf die entstehende Infarktgröße. Damit werden folglich auch die Fläche der „area at risk“ sowie Überlebensrate und Hämodynamik des Herzens beeinflusst (DEGABRIELE NM et al. 2004).

Obwohl viele pathophysiologische Mechanismen eines Myokardinfarktes nicht imitiert werden können, bietet das Tiermodell bei exakter Standardisierung und präziser Platzierung der Ligatur reproduzierbare Ergebnisse.

4.1.3. Die Echokardiographie zur quantifizierenden Charakterisierung der myokardialen Ischämie/Reperfusion

Die echokardiographische Messung des „fractional area change“ erfolgte in dieser Studie planimetrisch an den B-Mode-Aufnahmen. Dafür wurden die Bewegungen des murinen Herzens in der Längsachse dargestellt. Aus diesen Aufnahmen waren die enddiastolischen und endsystolischen Flächen bestimmbar. Bei diesem Verfahren wurden standardisierte Grundeinstellungen gewählt. Durch Darstellung der Herzlängsachse konnten auch kleinere Infarkte erfasst werden.

Messungen im M-Mode blieben unberücksichtigt, da die Infarktgebiete nicht zwingend in der Region der dafür standardisierten Schnittebene liegen. SUEHIRO et al. konnten eingehend darlegen, dass die planimetrische Analyse der 2D-Echokardiographie nach muriner myokardialer Ischämie/Reperfusion der des M-Mode deutlich überlegen ist. Auch hier wurde die „fractional area change“ (FAC) durch planimetrische Ausmessung von enddiastolischer sowie endsystolischer Fläche des linken Ventrikels ermittelt. Allerdings werden die Aufnahmen und damit auch die planimetrischen Ausmessungen durch Zugabe eines Kontrastmittels optimiert (SUEHIRO K et al. 2001).

Auf Ausmessungen 24 Stunden nach Infarkt wurde in dieser Studie verzichtet. Zum einen hätten Anfahrt und Untersuchung eine zu große Stressbelastung für die Tiere bedeutet, zum anderen ist die Funktionsstörung des Herzens nach 24 Stunden noch nicht voll ausgeprägt. Geringe Einschränkungen der Wandbewegung könnten durch Hyperkontraktilität der gegenüberliegenden Wand ausgeglichen werden. Nach sieben Tagen Reperfusionsdauer sind Remodelingprozesse des Herzens fortgeschrittener und lassen sich eher darstellen (KANNO S et al. 2002).

KANNO et al. verglichen zudem die Korrelation zwischen der histologisch ermittelten Infarktgröße und dem per 2D-Echokardiographie bestimmten enddiastolischen sowie – systolischen Volumen des linken Ventrikels. Diese Arbeitsgruppe konnte darlegen, dass die 2D-Echokardiographie eine hervorragende nichtinvasive quantitative Charakterisierung der Remodelingprozesse nach muriner myokardialer Ischämie/Reperfusion ermöglicht. Dabei ähnelten die murinen Veränderungen der Herzfunktion denen des Menschen (KANNO S et al. 2002).

4.2. Zur Anwendung des Maus-Myokardinfarkt-Modells

4.2.1. Komplikationsmöglichkeiten

Komplikationen, die während des chirurgischen Eingriffes auftreten können, sind zum einen starke Blutverluste und zum anderen Arrhythmien.

Das Blutvolumen bei Mäusen beträgt 70-80ml pro kg Körpergewicht. Somit würde eine Maus mit 25g Körpermasse eine Blutmenge von 1,7ml besitzen. Geringe Blutverluste bis 10% des Gesamtvolumens, wie durch Einstichlöcher im Myokard oder durch stumpfes Trennen des subkutanen Fettgewebes bleiben ohne Nebenwirkungen. Bei 15-20% Blutverlust wird von mittelgradigen Blutungen gesprochen. Sie entstehen durch Verletzungen von Blutgefäßen des Perikards oder Koronarvenen. Sie verursachen deutliche Nebenwirkungen, wie starken Blutdruckabfall und Abnahme des Hämoglobingehalts im Blut. Hochgradige Blutungen, die mehr als 20% des Gesamtvolumens ausmachen, sind durch entstehende Hypovolämie und Schockzuständen lebensbedrohend. Ursache einer hochgradigen Blutung kann die Verletzung der LAD oder der Vena thoracica interna sein (www.tierschutz-tvt.de).

Arrhythmien entstehen meist wenige Minuten nach Einsetzen der Ischämie, seltener bei Beginn der Reperfusion. Sie können Kammerflimmern und einen Herzstillstand auslösen.

Aszites kann nichtinfektiös durch die mittels chirurgischen Myokardinfarkts ausgelöste Herzinsuffizienz bedingt sein. Die infektiöse Form der Aszites kann durch kleinste Verunreinigungen der Injektionskanüle bei intraperitonealen Arzneimittelgaben verursacht werden. Da in dieser Studie wiederholt intraperitoneale Behandlungen durchgeführt werden (Narkosen, anti-CD147-Antikörper bzw. Isotypkontrolle) und somit die Gefahr des infektiös bedingten Aszites steigt, wurde besonderer Wert auf steriles Arbeiten gelegt.

4.2.2. Die heterozygot defiziente CD147^{+/-}-Maus als Modellspezifität

Da die homozygot defiziente CD147-Maus schwierig zu züchten ist, beschränkten wir uns in der vorliegenden Arbeit auf die Untersuchung der heterozygot defizienten CD147-Maus (CD147^{+/-}). Diese weist im Phänotyp keine Differenzen zum Wildtyp auf.

In unserer Arbeitsgruppe konnte auf Ebene der mRNA in der quantitativen PCR ein deutlicher Unterschied der CD147-Expression in der Milz nachgewiesen werden (CD147^{+/+}: 100%; CD147^{+/-}: 37,5% ± 0,5%)

Zudem konnte in Milzgeweben von CD147^{+/-}-Mäusen mittels Western Blot eine Minderexpression von CD147 auf Proteinebene gezeigt werden (SEIZER P et al., in Vorbereitung).

In der immunhistochemischen anti-CD147-Färbung wurde in Leber und Milz verminderte Expressionen, in Herz, Gehirn und Niere jedoch kein abweichendes Vorkommen von CD147 im Vergleich zur Wildtypmaus festgestellt.

Da eine CD147-Defizienz der unbehandelten CD147^{+/-}-Maus nachweisbar ist, wurde in dieser Studie der Einfluss der Heterozygose auf die Inflammation nach myokardialer Ischämie/Reperfusion untersucht. Während 24 Stunden nach dem chirurgischen Eingriff nur ein Trend erkennbar ist, kann sieben Tage nach Operation eine signifikante Verringerung der Infarktgröße beobachtet werden. Dieses Ergebnis wird in der echokardiographischen Untersuchung der Herzfunktion bestätigt. Das Ausmaß der Funktionseinschränkung ist bei der heterozygot defizienten Maus ebenfalls vermindert.

Die Standardisierung der Operationstechnik wird durch die nahezu übereinstimmenden Flächen der „area at risk“ deutlich. Somit ist es im Modell der myokardialen Ischämie/Reperfusion bei der Maus möglich, die Ligatur der LAD an definierter Stelle zu setzen, um eine übereinstimmende ischämische Region zu erzeugen. Diese exakte Positionierung der Ligatur wurde von AHN et al. als entscheidend beschrieben, um einen vergleichbaren Infarktbereich zu erhalten (AHN et al. 2004).

Weitergehende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten anhand HE-Färbungen der Infarkttrandzonen einen signifikanten Unterschied in der Zelldichte der Infarkttrandzonen zeigen (SEIZER P et al., in Vorbereitung).

YOUKER KA et al. konnten darstellen, dass die Zone zwischen Infarkt und lebensfähigem Gewebe die intensivsten inflammatorischen Reaktionen aufweist (YOUKER KA et al. 1994). Somit wurden die Auswertungen auf dieses Gebiet beschränkt.

Die Zellzahl beträgt:

Nach 24 Stunden Reperfusion bei CD147^{+/-}: 8437/mm² ± 491/mm²

CD147^{+/+}: 18385/mm² ± 662/mm².

Nach 7 Tagen Reperfusion bei CD147^{+/-}: 4638/mm² ± 257/mm²

CD147^{+/+}: 6853/mm² ± 296/mm².

Immunhistochemische Untersuchungen der Infarktzone von CD147^{+/-}-Mäusen zeigten gegenüber der Wildtypkontrolle ein verringertes Auftreten von Makrophagen, T-Zellen, neutrophilen Granulozyten und MMP9-positiven Zellen (SEIZER P et al., in Vorbereitung). Bei Betrachtung der Einzelwerte von Infarktgrößen und Anzahl migrierender Zellen ist eine Wechselbeziehung dieser beiden Parameter erkennbar (siehe Abb.58).

Es wird erkenntlich, dass die Größe des Infarktes in direktem Bezug zur Anzahl der einwandernden Zellen steht.

Anhand dieser Untersuchungsergebnisse kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Vielzahl der in das Inflammationsgebiet migrierenden Zellen Einfluss auf die entstehende Größe des Infarktes hat. Ebenso könnte auch die Infarktfläche die Anzahl einwandernder Zellen bestimmen.

Bezogen auf die Anzahl migrierender Zellen 24 Stunden nach myokardialer Ischämie/Reperfusion ist nach sieben Tagen eine Reduktion der Zellzahl feststellbar.

Bisher existieren keine Erkenntnisse über den Einfluss einer CD147-Defizienz auf die Infarktgröße. Dagegen sind die Konsequenzen eines MMP2- bzw. MMP9-Knockouts im murinen Modell der myokardialen Ischämie/Reperfusion bereits mehrfach beschrieben. ROMANIC et al. führten diesen chirurgischen Eingriff bei MMP9-defizienten Mäusen (MMP9^{-/-}) durch. Bei einer Ischämiedauer von 30 Minuten und 24 Stunden Reperfusion ist der Anteil des Infarkts an der „area at risk“ bei MMP9^{-/-}-Mäusen gegenüber der Wildtypkontrolle signifikant verringert. Durch immunhistochemische Färbungen und Untersuchung der Myeloperoxidase-Aktivität konnten ROMANIC et al. darstellen, dass die Anzahl eingewanderter neutrophiler Granulozyten bei MMP9^{-/-} Mäusen signifikant vermindert ist (ROMANIC AM et al. 2002). Bei permanenter Okklusion der LAD stellten LINDSEY et al. bei vergleichbarer Mortalität und Infarktgröße eine reduzierte Infiltration von Makrophagen bei MMP9^{-/-} Mäusen fest. Des Weiteren sind die Funktionseinschränkungen des linken Ventrikels sieben Tage nach myokardialer Ischämie/Reperfusion geringer und die einsetzende Angiogenese besser verteilt sowie ausgeprägter (LINDSEY ML et al. 2005).

Eine permanente Okklusion der LAD bei MMP2-defizienten Mäusen (MMP2^{-/-}) führt bei vergleichbarer Infarktgröße zu einer verringerten Anzahl von Ventrikelrupturen und geringerer Einschränkung der Herzpumpfunktion (HAYASHIDANI S et al. 2003). Dass CD147 in seiner Funktion als Regulator verschiedener MMPs abhängig von seinem Vorkommen ebenfalls Einfluss auf die Remodelingprozesse nach einem Myokardinfarkt haben kann, ist somit anzunehmen. In der zymographischen Untersuchung des Herzgewebes unbehandelter Mäuse zeigte die CD147^{+/-}-Maus eine verringerte MMP9-Aktivität. 24 Stunden

nach Operation sind die MMP9- und MMP2-Aktivitäten bei CD147^{+/+}-Mäusen und Wildtypkontrollen zwar deutlich hochreguliert, aber annähernd identisch. Ein möglicher Grund dafür kann sein, dass das gesamte Herz für diese Untersuchung lysiert wurde. Da ausschließlich der linke Ventrikel vom Infarkt betroffen ist, könnte das Lysat der linken Ventrikelwand deutlichere Ergebnisse liefern. Zudem müssten eine größere Anzahl von Mäusen auf ihre MMP-Aktivitäten im Myokard untersucht werden, um eine repräsentative Aussage treffen zu können. TAO et al. beschreiben den Peak der MMP9-Aktivität vier Tage und der MMP2-Aktivität sieben Tage nach myokardialer Ischämie/Reperfusion (TAO Z et al. 2003). Somit ist fraglich, inwieweit die MMP-Aktivität einen Einfluss auf die Infarktgröße 24 Stunden nach Operation hat. Vielmehr scheinen spätere Remodelingvorgänge durch MMP-Aktivität reguliert zu werden. Es ist möglich, dass die Fläche des Infarkts zunächst durch die Menge migrierender Entzündungszellen bestimmt wird und CypA als Chemoattraktant in diesem Prozess die größere Rolle spielt.

4.2.3. Der anti-CD147-Antikörper zur modellspezifischen Behandlung

Cyclophiline werden ubiquitär sezerniert und vor allem in Inflammationsgebieten in großer Menge vorgefunden. CD147 wird als Signalrezeptor für extrazelluläres CypA vermutet (YURCHENKO V et al. 2001). Dessen Expression auf Leukozyten ist in Entzündungsregionen ebenfalls erhöht (DAMSKER JM et al. 2007). Somit könnte ein Zusammenhang zwischen extrazellulären Cyclophilinen, der Expression von CD147 und der Entzündungsantwort bestehen. Die CypA-CD147-Interaktion könnte demnach direkt zur Inflammation beitragen und die Remodelingprozesse wesentlich beeinflussen.

DAMSKER et al. untersuchten *in vitro* den Einfluss des CD147-CypA-Systems auf die Chemotaxis von Leukozyten der Maus. Durch Anwendung des murinen anti-CD147-Antikörpers in der Boyden Chamber versuchten sie, die durch CypA induzierte Migration von Leukozyten zu stoppen. Tatsächlich wurde die Migration von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und CD4⁺ T-Zellen reduziert. Jedoch konnte eine weitere CD147-Funktion, nämlich Induktion bestimmter MMPs, durch den murinen Antikörper nicht gehemmt werden. Durch die Anwesenheit des anti-CD147-Antikörpers wurde die Sekretion von Pro-MMP9 auf murinen Fibroblasten nicht beeinflusst. DAMSKER et al. vermuten daher, dass für diese beiden Funktionen von CD147 unterschiedliche Domänen des transmembranalen Proteins zuständig sind. Somit lässt sich auch die Hemmung der chemotaktischen Funktion durch den anti-CD147-Antikörper bei erhaltener MMP-Sekretion erklären. *In vivo* konnte diese Arbeitsgruppe durch Einsatz des anti-CD147-Antikörpers bei der chronisch-entzündlichen Arthritis der Maus die Inflammation vermindern und klinische Parameter verbessern (DAMSKER JM et al. 2008).

GWINN et al. konnten *in vitro* nachweisen, dass die durch CypA ausgelöste Migration von CD4⁺ T-Zellen durch den anti-CD147-Antikörper verringert wird. Zudem wurde im murinen Asthmamodell die Einwanderung von eosinophilen Granulozyten und CD4⁺ T-Zellen ins entzündete Lungengewebe reduziert (GWINN WM et al. 2006).

Eine weitere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Migration von murinen neutrophilen Granulozyten in der Boyden Chamber abhängig von der Dosierung des eingesetzten CypA ist.

Diese Migration wird ebenfalls durch den anti-CD147-Antikörper gehemmt. Bei Einsatz eines anderen Chemoattraktants ist diese Inhibierung der Migration nicht vorzufinden. Somit kann festgestellt werden, dass die Hemmung durch den anti-CD147-Antikörper spezifisch auf die CypA-CD147-Interaktion wirkt. Auch in dieser Studie wird der Antikörper *in vivo* getestet: Im Mausmodell der akuten Lungenentzündung konnte die Infiltration neutrophiler Granulozyten verringert werden (ARORA K et al. 2005).

In der vorliegenden Studie untersuchten wir den Einfluss des anti-CD147-Antikörpers auf die Remodelingprozesse nach muriner myokardialer Ischämie/Reperfusion. Dazu wurde eine Gruppe C57Bl/6J-Mäuse nach dem bereits aufgeführten Protokoll mit dem Antikörper behandelt. Die Kontrollgruppe erhielt zu den entsprechenden Zeitpunkten die Isotypkontrolle. Die Behandlung mit anti-CD147-Antikörper führte sowohl nach 24 Stunden, als auch nach sieben Tagen zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße. Auch die Funktion des Herzens war bei den Mäusen, denen der Antikörper verabreicht wurde sieben Tage nach dem chirurgischen Eingriff signifikant weniger eingeschränkt. Zudem wurden 24 Stunden nach Operation die MMP-Aktivitäten im Herzgewebe untersucht. Während bei der MMP2-Aktivität kein deutlicher Unterschied zwischen Antikörper- und Isotyp-behandelten Mäusen erkennbar war, war der Mittelwert der MMP9-Aktivitäten bei den Mäusen, denen der anti-CD147-Antikörper injiziert wurde, verringert. Dabei ist allerdings anzumerken, dass Differenzen in der Ausprägung der MMP9-Aktivität beider Mäuse vorzufinden waren. Für eine gesicherte Aussage müssten weitere Mäuse untersucht werden.

In weitergehenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte zudem eine signifikant geringere Zelldichte in der Infarkttrandzone bei Antikörper-behandelten Mäusen festgestellt werden. Hierbei korreliert die Anzahl der Zellen mit der jeweiligen Fläche des Infarkts (siehe Abb.58).

Die Zellzahl beträgt nach 24 Stunden:

bei C57Bl/6J, behandelt mit anti CD147-Antikörper $12690/\text{mm}^2 \pm 1389/\text{mm}^2$

bei C57Bl/6J, behandelt mit CD147-Isotyp $20202/\text{mm}^2 \pm 865/\text{mm}^2$.

Sieben Tage nach myokardialer Ischämie/Reperfusion ist folgende Zellzahl erkennbar:

bei C57Bl/6J, behandelt mit anti CD147-Antikörper $3699/\text{mm}^2 \pm 399/\text{mm}^2$

bei C57Bl/6J, behandelt mit der Isotypkontrolle $4864/\text{mm}^2 \pm 469/\text{mm}^2$

(SEIZER P et al., in Vorbereitung).

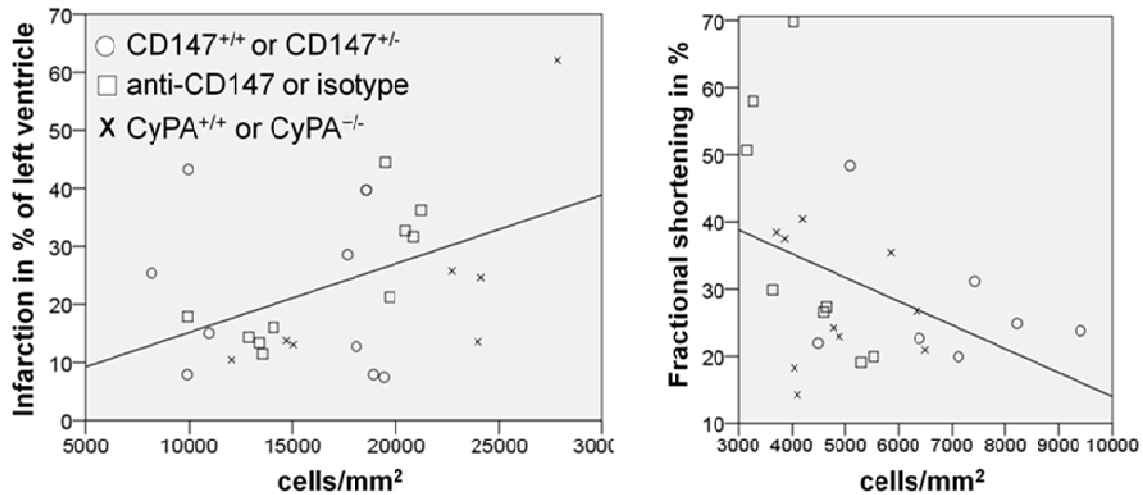


Abb.58: Korrelation zwischen Infarktgröße sowie linksventrikulärer Herzfunktion und Anzahl der Zellen in der Infarkttrandzone.

(aus SEIZER P et al, in Vorbereitung).

Immunzytologische Auswertungen bestätigten, dass neutrophile Granulozyten und Makrophagen die hauptsächlichen Zelltypen sind, welche in die Infarkttrandzone wandern und durch den anti-CD147-Antikörper inhibiert werden (SEIZER P et al., in Vorbereitung).

Dass der anti-CD147-Antikörper die durch CypA induzierte Chemotaxis von Entzündungszellen hemmt, wurde *in vitro* bereits mehrmals nachgewiesen. Vergleichbar zu den bereits aufgeführten *in vivo*-Modellen kann auch in dem vorliegenden murinen Modell der myokardialen Ischämie/Reperfusion ein Einfluss des Antikörpers auf die in das Inflammationsgebiet einwandernden Zellen gezeigt werden. Des Weiteren werden Konsequenzen eines Infarktes, wie Gewebnekrosen und Funktionseinschränkungen gemindert.

ARORA et al. konnten nachweisen, dass der anti-CD147-Antikörper spezifisch die durch das EMMPIN-CypA-System induzierte Zellmigration hemmt (ARORA K et al. 2005). Somit sind vermutlich die einwandernden Entzündungszellen ursächlich für die Remodelingprozesse nach myokardialer Ischämie/Reperfusion, die die Infarktgröße und Funktionseinschränkung bestimmen. Dass der Antikörper auch Einfluss auf die Aktivität von MMP9 bzw. MMP2 hat, konnte in dieser Studie weder bekräftigt noch ausgeschlossen werden.

4.2.4. Die Cyclophilin A-Knockout-Maus als Modellspezifität

CypA befindet sich intrazellulär, kann aber infolge inflammatorischer Stimuli in den extrazellulären Raum sezerniert werden, wo es als Chemoattraktant gegenüber Monozyten, T-Zellen sowie neutrophilen und eosinophilen Granulozyten wirkt (JIN ZG et al. 2000; SHERRY B et al. 1992; XU Q et al. 1992).

In der vorliegenden Studie konnte dargestellt werden, dass homozygot defiziente CypA-Mäuse (CypA^{-/-}) neben kleineren Infarktarealen auch geringere Einschränkungen der linksventrikulären Kontraktilität nach myokardialer Ischämie/Reperfusion aufweisen. In weitergehenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte bei den homozygot defizienten CypA-Mäusen (CypA^{-/-}) sowohl 24 Stunden als auch sieben Tage nach myokardialer Ischämie/Reperfusion eine signifikant verringerte Zelldichte in den Infarkttrandzonen ermittelt werden. Die Zellzahl beträgt nach 24 Stunden:

CypA^{-/-}: 13936,13/mm² ± 955,24/mm²

CypA^{+/+}: 24672,32/mm² ± 1101,9/mm².

Nach einer Reperfusionsdauer von sieben Tagen konnte folgende Zellzahl ermittelt werden:

CypA^{-/-}: 3969,15/mm² ± 112,69/mm²

CypA^{+/+}: 5672,71/mm² ± 359,94/mm² (SEIZER P et al., in Vorbereitung).

Diese Ergebnisse zeigen Übereinstimmungen mit einer kürzlich veröffentlichten Studie bezüglich der Rolle von CypA im Verlauf vaskulärer Erkrankungen. SATOH et al. konnten darlegen, dass bei CypA^{-/-}-Mäusen infolge AngiotensinII-Zufuhr signifikant weniger Aneurysmen entstehen. Zudem ist in diesen Arealen eine signifikant verringerte Akkumulation von Entzündungszellen zu beobachten (SATOH K et al. 2009).

Zuvor stellte dieselbe Arbeitsgruppe fest, dass die CypA-Expression zwei Wochen nach Ligatur der Arteria carotis mit dem Ausmaß der Hyperplasie von Gefäßintima und Media korreliert. Des Weiteren entwickelten CypA^{-/-}-Mäuse geringer ausgeprägte Hyperplasien sowie eine signifikant verringerte Infiltration des Inflammationsgebietes mit Entzündungszellen (SATOH K et al. 2008).

Parallelen zu den Erkenntnissen aus der vorliegenden Arbeit sind in der Studie von ZHU et al. aufzufinden. Nach unilateraler cerebraler Ischämie wiesen CypA^{-/-}-Mäuse signifikant kleinere Infarktgebiete und verminderte Gewebeverluste auf. Der Autor erklärt den neuroprotektiven Effekt der CypA-Defizienz mit verringerten Interaktionen zwischen CypA und AIF („apoptosis-inducing factor“), welche Chromatinolyse und Zellapoptosen hervorrufen (ZHU C et al. 2007). Der potentielle Einfluss migrierender Entzündungszellen auf die Infarktgröße bleibt in dieser Studie unberücksichtigt.

Da vergleichbare Effekte nach myokardialer Ischämie/Reperfusion bei der CypA^{-/-}-Maus, der CD147^{+/+}-Maus und der mit antiCD147-Antikörper-behandelten Maus auftreten, bekräftigt sich die Hypothese, dass die durch das CD147-CypA-System vermittelte Einwanderung von Entzündungszellen die Grundlage myokardialen Ischämieschadens darstellt.

4.3. Limitationen dieser Modellstudie

Obwohl die vorliegende Arbeit aussagekräftige Ergebnisse liefert, ist es durchaus notwendig, einige Durchführungen zu optimieren.

Zunächst erfolgte die Charakterisierung der CD147^{+/-}Maus nur unzureichend. Um Konklusionen zu treffen und diese eindeutig auf die genetische Veränderung der Maus zurückführen zu können, ist es notwendig, das Ausmaß der CD147-Defizienz zu quantifizieren.

Des Weiteren sind vor allem bei der Zymographie höhere Fallzahlen vonnöten, um die Ergebnisse verifizieren zu können. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da nach unserer Hypothese die Reduktion der Infarktgröße vorrangig auf den migrierenden Zellen und weniger auf die Hochregulation der MMP-Aktivität beruht.

Zudem könnte die Echokardiographie durch präoperative Untersuchungen optimiert werden, um die tatsächliche Reduktion des FAC durch die myokardiale Ischämie/Reperfusion zu bestimmen. Da das UKT Tübingen über kein solches Gerät verfügt, war die Durchführung dieser Untersuchungen aufgrund von Hygienebestimmungen der Tierhaltung nicht möglich.

Prädisponierende Faktoren, wie Adipositas, Diabetes mellitus, Nikotinabusus oder bereits vorhandene atherosklerotische Veränderungen werden bei dieser Studie nicht berücksichtigt. Mögliche Einwirkungen dieser Faktoren auf das myokardiale Remodeling sind somit nicht ausgeschlossen.

Der von KATO et al. beobachtete Effekt der CD147-E-Selektin-Interaktion auf die Entzündungsvorgänge nach renaler Ischämie und Reperfusion ist möglicherweise auch in dieser Studie ein entscheidender Einflussfaktor (KATO N et al. 2009). Allerdings wurden neutrophile Granulozyten der CD147^{+/-} Maus bisher noch nicht auf ihr Bindungsverhalten gegenüber E-Selektin untersucht. Somit könnte die direkte Bindung an E-Selektin die Migration fördern und eine wichtige Rolle im Inflammationsgeschehen spielen.

4.4. Schlussfolgerungen

Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss des CD147-CypA-Systems auf die Remodelingprozesse nach muriner myokardialer Ischämie/Reperfusion zu evaluieren.

Es konnte zum einen sowohl an der heterozygot CD147-defizienten Maus als auch durch Zugabe eines anti-CD147-Antikörpers gezeigt werden, dass eine CD147-Defizienz die Inflamationsprozesse zugunsten des Tieres reguliert. Zum anderen wirkte die CypA-Defizienz protektiv gegenüber Schäden des Herzmuskels durch myokardiale Ischämie/Reperfusion bei der CypA^{-/-}-Maus.

Basierend auf diesen verschiedenen *in vivo* Strategien der CD147-Hemmung wurde dargestellt, dass durch Inhibierung eines CD147-abhängigen Systems die Zellmigration vermindert, die Infarktgröße verringert und die kardiale Funktion verbessert wird. Übereinstimmende Effekte wurden nach myokardialer Ischämie/Reperfusion bei der CypA^{-/-}-Maus beobachtet.

CD147 ruft die Chemotaxis von Entzündungszellen über die Interaktion mit CypA hervor (BUKRINSKY MI 2002). Des Weiteren wird die Migration von Leukozyten CD147-abhängig durch direkte Bindung an den Adhäsionsrezeptor E-Selektin beeinflusst (KATO N et al. 2009).

In bereits aufgeführten Migrationsversuchen konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass CypA CD147-abhängig die Migration verschiedener Entzündungszellen fördert. Sobald durch den anti-CD147-Antikörper ein Defizit an verfügbaren CD147 hervorgerufen wird, verringert sich die Zellmigration. Im Asthmodell sowie in Mausmodellen chronisch entzündlicher Arthritis und akuter Lungenentzündung konnten *in vivo* Inflamationsvorgänge vermindert und klinische Parameter verbessert werden (DAMSKER JM et al. 2008; GWINN WM et al. 2006; ARORA K et al. 2005). Unsere Hypothese beruht auf diesen bereits sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durchgeführten Untersuchungen. Demnach wird im ischämischen Myokardgewebe durch inflammatorische Stimuli CypA in den Extrazellulärraum sezerniert (SEKO Y et al. 2004; JIN ZG et al. 2000). Über den Signalrezeptor CD147 werden chemotaktische Signale freigegeben, die Entzündungszellen anlocken. Durch ein CD147-Defizit kommt es zur Reduktion des untergegangenen Gewebes, wodurch sich die Infarktgröße verringert. Eine Minderung der Infarktfläche führt zu einer weniger beeinträchtigten Ventrikelfunktion. Somit stellt die durch CD147-CypA-Interaktion hervorgerufene Leukozyteninfiltration eine wichtige Grundlage für die durch Ischämie und Reperfusion entstehenden myokardialen Schäden dar. Die Korrelationen zwischen Ergebnissen der Echokardiographie und Infarktgröße, sowie Anzahl der Zellen zur Infarktgröße verdeutlicht die Komplexität des myokardialen Remodelings. Somit beeinflusst die Anzahl der in das Inflamationsgebiet migrierenden Zellen direkt die entstehende Infarktgröße. Diese wiederum steht in Zusammenhang mit der Funktion des linken Ventrikels.

Die Migration von Leukozyten spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung myokardialer Schäden nach Ischämie und Reperfusion. NIGAM und KOPECKY konnten in Tiermodellen durch Inhibierung einzelner Adhäsionsrezeptoren mittels monoklonaler Antikörper die Reperfusionsschäden minimieren (NIGAM A, KOPECKY SL 2002). Bei der Anwendung am Menschen war diese Strategie jedoch nicht erfolgreich. Es wird deutlich, dass Ergebnisse aus Tiermodellen nicht vollständig auf den Menschen übertragbar sind. Des Weiteren sollte ein therapeutisches Agens auf verschiedene Faktoren, die am Inflammationsprozess beteiligt sind, wirken. CD147 befindet sich sowohl auf Entzündungszellen, als auch auf Kardiomyozyten. Es ist an der CypA-abhängigen Chemotaxis sowie an der durch direkte Bindung an E-Selektin hervorgerufenen Adhärenz der Leukozyten beteiligt. Zudem erleichtert CD147 durch Induktion von MMPs und somit hervorgerufenem Abbau der Extrazellulären Matrix die Einwanderung von Entzündungszellen. Die Hemmung von CD147 wäre demnach ein Therapieansatz, der verschiedene Pfade der Aktivierungskaskade einer Inflammation einschränkt.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit sollten durch weitergehende Untersuchungen verifiziert werden. Zunächst sollte eine Erhöhung der Fallzahlen auf mindestens sechs Tiere pro Gruppe erfolgen, um die Ergebnisse verifizieren zu können. Es wäre durch Langzeitversuche möglich, den Einfluss von CD147 und CypA auf spätere myokardiale Remodelingprozesse zu beurteilen. Zudem kann durch Hemmung von E-Selektin dessen Beteiligung an der Leukozytenmigration nach myokardialer Ischämie/Reperfusion untersucht werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Durch moderne Methoden therapeutischen Eingreifens ist die Letalität des akuten Myokardinfarkts drastisch gesunken, doch Ischämie-Reperfusionsschäden sowie nachfolgende Remodelingvorgänge führen oft zu einer langfristigen Beeinträchtigung der Lebensqualität.

Diese Studie beschreibt erstmals den Einfluss des CD147-CypA-Systems auf myokardiale Schäden nach chirurgisch erzeugter Ischämie/Reperfusion.

Die Hypothese lautet, dass durch Ischämie und Reperfusion geschädigte Kardiomyozyten CypA in den Extrazellularraum sezernieren, welches CD147-abhängig zur Migration von Entzündungszellen führt. Der „extracellular matrix metalloproteinase inducer“ CD147 verursacht die Produktion von MMPs, die die Extrazelluläre Matrix abbauen und die Infiltration mit Leukozyten erleichtern. Aufgrund dieser proinflammatorischen Wirkung fördert das CD147-CypA-System die Ausprägung des Ischämie-Reperfusionsschadens.

Es sollte mittels drei verschiedener *in vivo* Strategien im Mausmodell eine CD147- oder CypA - Defizienz erreicht und die Auswirkungen auf die kardiale Ventrikelfunktion (%FAC), die Infarktgröße (%I/AaR, %I/LV), sowie Zellinfiltration untersucht werden. Des Weiteren sollte veranschaulicht werden, inwiefern MMP2 und MMP9 aktiviert werden und welchen Einfluss diese auf die myokardialen Umbauprozesse haben.

Heterozygot defiziente Basiginmäuse (CD147^{+/-}), mit anti-CD147-Antikörper behandelte C57Bl/6J-Mäuse sowie homozygot defiziente CypA-Mäuse (CypA^{-/-}) und entsprechende Kontrollen erhielten eine durch 30minütige Ligatur der LAD ausgelöste myokardiale Ischämie/Reperfusion. Die Euthanasie der Tiere erfolgte nach einer Reperfusionsdauer von 24 Stunden bzw. sieben Tagen. Es wurden echokardiographische Untersuchungen sowie planimetrische Bestimmungen der Infarktgrößen, der „area at risk“, zymographische Darstellung der MMP2 und MMP9-Aktivitäten sowie HE-Färbungen durchgeführt.

Bei der CD147^{+/-}Maus konnte dieser Zusammenhang 24 Stunden nach myokardialer Ischämie/Reperfusion nur angedeutet werden. Sieben Tage nach Operation wurde dieses Ergebnis durch eine signifikant reduzierte Infarktgröße bzw. signifikant weniger eingeschränkte Ventrikelfunktion bestätigt. Die histologische Aufarbeitung der Infarkttrandzonen ergab zudem eine signifikant verringerte Zelldichte. Die Bestimmung der MMP-Aktivitäten ergab 24 Stunden *post operationem* zwar eine gesteigerte Aktivität gegenüber der nicht operierten Maus, weist aber keine deutliche Differenz zwischen CD147^{+/-}Mäusen und der Wildtypkontrolle auf.

Um diese Ergebnisse zu bekräftigen stellten wir die pharmakologische Inhibierung von CD147 der genetisch bedingten gegenüber. Die mit anti-CD147-Antikörper behandelten C57Bl/6J-Mäuse zeigten eine signifikant verringerte Infarktgröße und Zelldichte in den Infarkttrandbereichen. Zudem war sieben Tage nach chirurgischem Eingriff die Ventrikelfunktion signifikant weniger eingeschränkt.

Myokardiale Ischämie/Reperfusion führte bei CypA^{-/-}Mäusen zu einer signifikant verringerten Infarktgröße und Zelldichte in der Infarktnarbe sowie einer signifikant besser erhaltenen Kontraktilität des linken Ventrikels.

Somit konnte eingehend dargestellt werden, dass durch Inhibierung von CD147 oder dem Ligand CypA die Infarktgröße verringert, die kardiale Funktion verbessert und die Zellmigration vermindert wird. Dabei spielt die Funktion von CD147 als Signalrezeptor für CypA die herausragende Rolle, da die MMP-Aktivität zumindest nach 24 Stunden Reperfusionsdauer nicht durch die CD147-Defizienz beeinflusst wird.

CD147 ist sowohl an der CypA-abhängigen Chemotaxis von Leukozyten, als auch an der durch direkte Bindung an E-Selektin hervorgerufenen Adhärenz der Leukozyten beteiligt. Zudem erleichtert CD147 durch Induktion von MMPs und dem dadurch hervorgerufenen Abbau der Extrazellulären Matrix des Herzens die Migration von inflammatorischen Zellen. Somit stellt die Hemmung des proinflammatorisch wirkenden CD147-CypA-Systems einen Therapieansatz dar, der verschiedene Pfade der Aktivierungskaskade einer Entzündung einschränkt.

6. SUMMARY

CD147 (EMMPRIN) and its ligand Cyclophilin A determine myocardial injury upon ischemia and reperfusion.

Because of modern therapeutic methods the mortality after acute myocardial infarction in human is reduced. Nevertheless ischemic injury and myocardial remodeling are often followed by limitations in the way of life for a long time.

The aim of the present study is to characterize the influence of CD147 and its ligand CypA in myocardial infarction and remodeling. Our hypothesis declares, that cardiomyocytes injured by ischemia and reperfusion release CypA in the extracellular space. CypA promotes CD147-dependent the migration of inflammatory cells. Moreover, the “extracellular matrix metalloproteinase inducer” CD147 activates MMPs, which disintegrate the extracellular matrix and supports leukocyte migration in this way. Because of its proinflammatory effect the CD147-CypA-axis determine myocardial injury upon ischemia and reperfusion.

Based on three different *in vivo* methods we want to reach an interruption of the CD147-CypA-interaction in a murine model of myocardial ischemia and reperfusion. Our goal is to characterize its effect on infarct size, systolic function, migration of inflammatory cells and MMP2 as well as MMP9 activity.

We induced acute myocardial infarction by ligation of the LAD for 30 minutes followed by reperfusion in CD147^{+/-} mice, C57Bl/6J mice which were treated with an anti-CD147-antibody and CypA^{-/-} as well as controls. Mice were sacrificed either after 24 hours or seven days. We analyzed cardiac function by echocardiography, infarct size by planimetric determination, MMP2 and MMP9 activity by zymography. Furthermore, hematoxylin-eosin-staining and immunohistochemistry was performed to evaluate leukocyte density in the infarct border zone. In this way the proinflammatory effect of CD147 and its ligand CypA in myocardial infarction and remodeling process should be demonstrated.

In CD147^{+/-} mice which were sacrificed 24 hours post myocardial infarction this connection can solely be indicated. Seven days post surgical intervention the deficiency of CD147 reduces infarct size related to a similar area at risk and preserves systolic function significantly. Furthermore, cell density is significantly reduced in the infarct border zone. MMP-activity is enhanced 24 hours post myocardial infarction, nevertheless there is no significant difference between CD147^{+/-} mice and CD147^{+/+} mice.

To add more evidence to our findings we compared the genetic deficiency of CD147 with the pharmacological inhibition. Therefore wild type mice were treated with an anti-CD147-antibody or isotype control. Mice treated with the antibody demonstrate significantly reduced infarct sizes and cell density in the infarct border zone. Moreover, seven days post surgical intervention the systolic function is preserved.

Myocardial ischemia/reperfusion in CypA^{-/-} mice leads to a significantly reduced infarct size and cell recruitment into the infarct border zone. Furthermore the systolic function is preserved.

SUMMARY

It could be demonstrated in detail that inhibition of CD147 or its ligand CypA leads to a reduced infarct size, cell recruitment and a preserved systolic function after myocardial ischemia/reperfusion. The CD147-ligand CypA seems to have the prominent effect, because after 24 hours reperfusion the MMP-activity is not influenced by a CD147-deficiency.

CD147 mediates the chemotactic function of CypA as well as leukocyte adhesion via its direct binding to the adhesion receptor E-selectin. Furthermore, CD147 supports the migration of leukocytes by a MMP-dependent proteolysis of extracellular matrix components. Therefore, CD147 may represent a useful therapeutic agent because it is involved in several pathways of cardiac inflammation.

7. LITERATURVERZEICHNIS

AHN D, CHENG L, MOON C, SPURGEON H, LAKATTA EG, TALAN MI (2004)
Induction of myocardial infarcts of a predictable size and location by branch pattern probability-assisted coronary ligation in C57BL/6 mice.

Am J Physiol Heart Circ Physiol; 286: H1201-1207

ALTRUDA F, CERVELLA P, GAETA ML, DANIELE A, GIANCOTTI F, TARONE G, STEFANUTO G, SILENGO L (1989)

Cloning of c-DNA for a novel mouse membrane glycoprotein (gp43): shared identity to histocompatibility antigens, immunoglobulins and neural cell adhesion molecules.

Gene; 85(2): 445-451

BARTH E, STÄMMLER G, SPEISER B, SCHAPER J (1992)

Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man.

J Mol Cell Cardiol; 24(7): 669-681

BETSUYAKU T, KADOMATSU K, GRIFFIN GL, MURAMATSU T, SENIOR RM (2003)

Increased basigin in bleomycin-induced lung injury.

Am J Respir Cell Mol Biol; 28(5): 600-606

BILLICH A, WINKLER G, ASCHAUER H, ROT A, PEICHL P (1997)

Presence of CypA in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis.

J Exp Med; 185(5): 975-980

BISWAS C (1982)

Tumor cell stimulation of collagenase production by fibroblasts.

Biochem Biophys Res Commun; 109(3): 1026-1034

BISWAS C, NUGENT MA (1987)

Membrane association of collagenase stimulatory factor(s) from B-16 melanoma cells.

J Cell Biochem; 35(3): 247-258

BISWAS C, ZHANG Y, DECASTRO R, GUO H, NAKAMURA T, KATAOKA H, NABESHIMA K (1995)

The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed CD147) is a member of the immunoglobulin superfamily.

Cancer Res; 55(2): 434-439

BORG TK, CAULFIELD JB (1981)

The collagen matrix of the heart.

Fed Proc; 40(7): 2037-2041

BOULOS S, MELONI BP, ARTHUR PG, MAIDA B, BOJARSKI C, KNUCKEY NW (2007)

Evidence that intracellular CypA and CypA/CD147 receptor-mediated ERK $\frac{1}{2}$ signaling can protect neurons against in vitro oxidative and ischemic injury.

Neurobiol Dis; 25(1): 54-64

BRADHAM WS, MOE G, WENDT KA, SCOTT AA, KONIG A, ROMANOVA M, NAIK G, SPINALE FG (2002)

TNF- α and myocardial matrix metalloproteinases in heart failure: relationship to LV remodeling.

Am J Physiol Heart Circ Physiol; 282(4): H1288-1295

BUKRINSKY MI (2002)

Cyclophilins: unexpected messengers in intercellular communications.

Trends Immunol; 23: 323-325

BURGGRAF D, LIEBETRAU M, MARTENS HK, WUNDERLICH N, JÄGER G, DICHGANS M, HAMANN GF (2005)

Matrix metalloproteinase induction by CD147 in experimental focal cerebral ischemia. Eur J Neurosci; 22(1): 273-277

CAO J, DREWS M, LEE HM, CONNER C, BAHOU WF, ZUCKER S (1998)

The propeptide domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase is required for binding of tissue inhibitor of metalloproteinases and for activation of pro-gelatinase a.

J Biol Chem; 273(52): 34745-34752

COLGAN J, ASMAL M, NEAGU M, YU B, SCHNEIDKRAUT J, LEE Y, SOKOLKAJA E, ANDREOTTI A, LUBAN J (2004)

CypA regulates TCR signal strength in CD4⁺ T-cells via a proline-directed conformational switch in Itk.

Immunity; 21: 189-201

COLGAN J, ASMAL M, YU B, LUBAN J (2004)

CypA-deficient mice are resistant to immunosuppression by cyclosporine.

J Immunol; 174: 6030-6038

CONSTANTINIDES P (1966)

Plaque fissures in human coronary thrombosis.

J Atheroscler Res 6, 1-17

DAMSKER JM, OKWUMABUA I, PUSHKARSKI T, ARORA K, BUKRINSKY MI, CONSTANT SL (2008)

Targeting the chemotactic function of CD147 reduces collagen-induced arthritis.

Immunol; 126: 55-62

DAVIDSON B, GIVANT-HORWITZ V, LAZAROVICI P, RISBERG B, NESLAND JM, TROPE CG, SCHAEFER E, REICH R (2003)

Matrix metalloproteinases (MMP), CD147 (extracellular matrix metalloproteinase inducer) and mitogen-activated protein kinases (MAPK): co-expression in metastatic serous ovarian carcinoma.

Clin Exp Metastasis; 20: 621-631

- DAVIDSON B, GOLDBERG I, BERNER A, KRISTENSEN GB, REICH R (2003)
CD147 (extracellular matrix metalloproteinase inducer) is a novel marker of poor outcome in serious ovarian carcinoma.
Clin Exp Metastasis; 20: 161-169
- DE CELLE T, CLEUTJENS JP, BLANKENSTEIJN WM, DEBETS JJ, SMITS JF, JANSSEN BJ (2004)
Long-term structural and functional consequences of cardiac ischaemia-reperfusion injury *in vivo* in mice.
Exp Physiol; 89: 605-615
- DE CEUNINCK F, ALLAIN F, CALIEZ A, SPIK G, VANHOUTTE PM (2003)
High binding capacity of cyclophilin B to chondrocyte heparin sulfate proteoglycans and its release from the cell surface by matrix metalloproteinases.
Arthritis and Rheumatism; 48: 2197-2206
- DEAN NR, NEWMAN JR, HELMAN EE, ZHANG W, SAVAFY S, WEEKS DM, CUNNINGHAM M, SNYDER LA, TANG Y, YAN L, McNALLY LR, BUCHSBAUM DJ, ROSENTHAL EL (2009)
Anti-CD147 monoclonal antibody as a novel target for therapy of head and neck cancer. Clin Cancer Res; 15: 4058-4065
- DEAR JW, LEELAHAVANICHKUL A, APONTE A, HU X, CONSTANT SL, HEWITT SM, YUEN PST, STAR RA (2007)
Liver proteomics for therapeutic drug discovery: inhibition of the cyclophilin receptor CD147 attenuates sepsis-induced acute renal failure.
Crit Care Med; 35: 2319-2328
- DEGABRIELE NM, GRIESENBACH U, SATO K, POST MJ, ZHU J, WILLIAMS J, JEFFERY PK, GEDDES DM, ALTON EW (2004)
Critical appraisal of the mouse model of myocardial infarction.
Exp Physiol; 89(4): 497-505
- DEUTICKE B (1982)
Monocarboxylate transport in erythrocytes.
J Membr Biol; 70(2): 89-103
- DEWALD O, REN G, DUERR GD, ZOERLEIN M, KLEMM C, GERSCH C, TINCEY S, MICHAEL LH, ENTMAN ML, FRANGOGIANNIS NG (2004)
Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction.
Am J Pathol; 164: 665-677
- DU XJ, GAO XM, JENNINGS G, DART AM, WOODCOCK EA (2000)
Preserved ventricular contractility in infarcted mouse heart overexpressing beta(2)-adrenergic receptors.
Am J Physiol Heart Circ Physiol; 279(5): H2456-H2463

- DUCHARME A, FRANTZ S, AIKAWA M, RABKIN E, LINDSEY M, ROHDE LE, SCHOEN FJ, KELLY RA, WERB Z, LIBBY P, LEE RT (2000)
Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction.
J Clin Invest; 106(1): 55-62
- ENGELHARDT W, BREVES G (2000)
Herz. In: Engelhardt W., Breves G. (Hrsg): Physiologie der Haustiere.
Enke Verlag, Stuttgart 2000, 143-168
- FAN QW, YUASA S, KUNO N, SENDA T, KOBAYASHI M, MURAMATSU T, KADOMATSU K (1998)
Expression of basigin, a member of the immunoglobulin superfamily, in the mouse central nervous system.
Neurosci. Res; 30(1): 53-63
- FERRARI R (1995)
Metabolic disturbances during myocardial ischemia and reperfusion.
Am J Cardiol; 24: 17B-24B
- FERRARI R, CECONI C, CURELLO S, GUARNIERI C, CALDARERA CM, ALBERTINI A, VISIOLI O (1985)
Oxygen-mediated myocardial damage during ischaemia and reperfusion: role of the cellular defences against oxygen toxicity.
J Mol Cellular Cardiol; 17: 937-945
- FERRARI R, PEPI P, FERRARI F, NESTA F, BENIGNO M, VISIOLI O (1998)
Metabolic derangement in ischemic heart disease and its therapeutic control.
Am J Cardiol; 82: 2K-13K
- FISCHER K, HOFFMANN P, VOELKL S, MEIDENBAUER N, AMMER J, EDINGER M, GOTTFRIED E, SCHWARZ S, ROTHE G, HOVES S, RENNER K, TIMISCHL B, MACKENSEN A, KUNZ-SCHUGHART L, ANDREESSEN R, KRAUSE SW, KREUTZ M (2007)
Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells.
Blood; 109: 3812-3819
- FODA HD, ROLLO EE, DREWS M, CONNER C, APPELT K, SHALINSKY DR, ZUCKER S (2001)
Ventilator-induced lung injury upregulates and activates gelatinases and CD147: attenuation by the synthetic matrix metalloproteinase inhibitor, Prinomastat.
Am J Respir Cell Mol Biol; 25(6): 717-724
- FOSSUM S, MALLETT S, BARCLAY AN (1991)
The MRC OX-47 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily with an unusual transmembrane sequence.
Eur J Immunol; 21(3): 671-679
- FRANGIGIANNIS NG, SMITH CW, ENTMAN ML (2002)
The inflammatory response in myocardial infarction.
Cardiovasc Res; 52: 31-47

FROBERG MK, GERHART DZ, ENERSON BE, MANIVEL C, GUZMAN-PAZ M, SEACOTTE N, DREWES LR (2001)

Expression of monocarboxylate transporter MCT1 in normal and neoplastic human CNS tissues.

Neuroreport; 12(4): 761-765

FUJIMURA M, GASCHE Y, MORITA-FUJIMURA Y, MASSENGALE J, KAWASE M, CHAN PH (1999)

Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion.

Brain Res; 842(1): 92-100

GALAT A (1993)

Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins.

Eur J Biochem; 216(3): 689-707

GAO XM, DART AM, DEWAR E, JENNINGS G, DU XJ (2000)

Serial echocardiographic assessment of left ventricular dimensions and function after myocardial infarction in mice.

Cardiovasc Res; 45(2): 330-338

GARDIN JM, SIRI FM, KITSIS RN, EDWARDS JG, LEINWAND LA (1995)

Echocardiographic assessment of left ventricular mass and systolic function in mice.

Circ Res; 76(5): 907-914

GOLDMAN S, SHALEV E (2003)

The role of the matrix metalloproteinases in human endometrial and ovarian cycles.

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol; 111(2): 109-121

GOTTSHALL KR, HUNTER JJ, TANAKA N, DALTON N, BECKER KD, ROSS J Jr., CHIEN KR (1997)

Ras-dependent pathways induce obstructive hypertrophy in echo-selected transgenic mice.

Proc Natl Acad Sci USA; 94(9): 4710-4715

GWINN WM, DAMSKER JM, FALAHATI R, OKWUMABUA I, KELLY-WELCH A, KEEGAN AD, VANPUILLE C, LEE JJ, DENT LA, LEITENBERG D, BUKRINSKY MI, CONSTANT SL (2006)

Novel approach to inhibit asthma-mediated lung inflammation using anti-CD147 intervention.

J Immunol; 177: 4870-4879

HACKETT D, MCKENNA W, DAVIES G, MASERI A (1990)

Reperfusion arrhythmias are rare during acute myocardial infarction and thrombolysis in man.

Int J Cardiol; 29, 205-213

HALESTRAP AP, MEREDITH D (2004)

The SLC16 gene family – from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond.

Eur J Physiol; 447: 619-628

HALESTRAP AP, PRICE NT (1999)

The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation.

Biochem J; 343: 281-299

HANDSCHUMACHER RE, HARDING MW, RICE J, DRUGGE RJ, SPEICHER DW (1984)

Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporine A.

Science; 226(4674): 544-547

HANSSON GK, LIBBY P, SCHÖNBECK U, YAN ZQ (2002)

Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis.

Circ Res; 91: 281-291

HANSSON GK, ROBERTSON AL, SÖDERBERG-NAUCLER (2006)

Inflammation and atherosclerosis.

Annu Rev Pathol Mech Dis; 1: 297-329

HAUG C, LENZ C, DIAZ F, BACHEM MG (2004)

Oxidized low-density lipoproteins stimulate extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) release by coronary smooth muscle cells.

Arterioscler Thromb Vasc Biol; 24(10): 1823-1829

HAYASHIDANI S, TSUTSUI H, IKEUCHI M, SHIOMI T, MATSUSAKA H, KUBOTA T, IMANAKA-YOSHIDA K, ITOH T, TAKESHITA A (2003)

Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction.

Am J Physiol Heart Circ Physiol; 285(3): H1229-H1235

HENKE J, ERHARDT W (2004)

Speziesspezifische Anästhetika/ Nager. In: Erhardt W, Henke J, Haberstroh J (Hrsg): „Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier“.

Schattauer Verlag, Stuttgart, 657

HORI K, KATAYAMA N, KACHI S, KONDO M, KADOMATSU K, USUKURA J, MURAMATSU T, MORI S, MIYAKE Y (2000)

Retinal dysfunction in basigin deficiency.

Invest Ophthalmol Vis Sci; 41: 1328-1333

HUANG Z, HUANG H, LI H, CHEN W, PAN C (2009)

CD147 expression in tongue squamous cell carcinoma.

J Oral Pathol Med; 38: 518-523

IACONO KT, BROWN AL, GREENE MI, SAOUAF SJ (2007)

CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology.

Exp Mol Pathol; 283-295

IGAKURA T, KADOMATSU K, KANAME T, MURAMATSU H, FAN QW, MIYAUCHI T, TOYAMA Y, KUNO N, YUASA S, TAKAHASHI M, SENDA T, TAGUCHI O, YAMAMURA K, ARIMURA K, MURAMATSU T (1998)

A null mutation in basigin, an immunoglobulin superfamily member, indicates its important roles in peri-implantation development and spermatogenesis.

Dev Biol; 194: 152-165

IGAKURA T, KADOMATSU K, TAGUCHI O, MURAMATSU H, KANAME T, MIYAUCHI T, YAMAMURA K, ARIMURA K, MURAMATSU T (1996)

Roles of basigin, a member of the immunoglobulin superfamily, in behavior as to an irritating odor, lymphocyte response, and blood-brain barrier.

Biochem Biophys Res Commun; 224: 33-36

JANEWAY CA Jr., MEDZHITOV R (2002)

Innate immune recognition.

Annu Rev Immunol; 20: 197-216

JANSE MJ, KLEBER AG (1981)

Electrophysiological changes and ventricular arrhythmias in the early phase of regional myocardial ischemia.

Circ Res; 49: 1069-1081

JENNINGS RB, REIMER KA (1991)

The cell biology of acute myocardial ischemia.

Annu Rev Med; 42: 225-246

JENNINGS RB, SCHAPER J, HILL ML, STEENBERGEN C, REIMER KA (1985)

Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury: changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure.

Circ Res; 49: 892-900

JENNINGS RB, STEENBERGEN C Jr., KINNEY RB, HILL ML, REIMER KA (1983)

Comparison of the effect of ischaemia and anoxia on the sarcolemma of the dog heart.

Europ heart J; 4: 123-137

JIANG J, TANG J (2007)

CD147 and its interacting proteins in cellular functions.

Acta Physiologica Sinica; 59: 517-523

JIN JS, HSIEH DS, LIN YF, WANG JY, SHEU LF, LEE WH (2006)

Increasing expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in renal cell carcinoma: tissue microarray analysis of immunostaining score with clinicopathological parameters.

Int J Urol; 13: 573-580

JIN ZG, LUNGU AO, XIE L, WANG M, WONG C, BERK BC (2004)

CypA is a proinflammatory cytokine that activates endothelial cells.

Arterioscler Thromb Vasc Biol; 24: 1186-1191

JIN ZG, MELARAGNO MG, LIAO DF, YAN C, HAENDELER J, SUH YA, LAMBETH JD, BERK BC (2000)

CypA is a secreted growth factor induced by oxidative stress.

Circ Res; 87(9): 789-796

JONES SP, HOFFMEYER MR, SHARP BR, HO Y, LEFER DJ (2003)

Role of intracellular and antioxidant enzymes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion.

Am J Physiol: Heart Circ Physiol; 284: H277-H282

JONES SP, LEFER DJ (2000)

Myocardial reperfusion injury: insights gained from gene-targeted mice.

News Physiol Sci; 15: 303-308

KAMINSKI KA, BONDA TA, KORECKI J, MUSIAL WJ (2002)

Oxidative stress and neutrophil activation-the two keystones of ischemia/reperfusion injury.

Int J Cardiol; 26: 41-59

KANNO S, LERNER DL, SCHUESSLER RB, BETSUYAKU T, YAMADA KA, SAFFITZ JE, KOVACS A (2002)

Echocardiographic evaluation of ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction.

J Am Soc Echocardiogr; 15(6): 601-609

KASINRERK W, FIEBIGER E, STEFANOVA I, BAUMRUKER T, KNAPP W, STOCKINGER H (1992)

Human leukocyte activation antigen M6, a member of the Ig superfamily, is the species homologue of rat OX-47, mouse basigin, and chicken HT7 molecule.

J Immunol; 149(3): 847-854

KATAOKA H, DECASTRO R, ZUCKER S, BISWAS C (1993)

Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin and 72kDa gelatinase.

Cancer Res; 53: 3154-3158

KATO N, YUZAWA Y, KOSUGI T, HOB0 A, SATO W, MIWA Y, SAKAMOTO K, MATSUO S, KADOMATSU K (2009)

The E-selectin ligand basigin/CD147 is responsible for neutrophil recruitment in renal ischemia/reperfusion.

J Am Soc Nephrol; 20(7): 1565-1576

KIRK P, WILSON MC, HEDDLE C, BROWN MH, BARCLAY AN, HALESTRAP AP (2000)

CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression.

EMBO J; 19(15): 3896-3904

KITA T, ISHII K, YOKODE M, KUME N, NAGANO Y, ARAI H, KAWAI C (1990)

The role of oxidized low density lipoprotein in the pathogenesis of atherosclerosis.

Eur Heart J; Suppl E: 122-127

KLONER RA, JENNINGS RB (2001)

Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2.

Circ; 104: 3158-3167

KLONER RA, JENNINGS RB (2001)

Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1.

Circ; 104: 2981-2989

KUKIELKA GL, HAWKINS HK, MICHAEL L, MANNING AM, YOUKER K, LANE C, ENTMAN ML, SMITH CW, ANDERSON DC (1993)

Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in ischemic and reperfused canine myocardium.

J Clin Invest; 92(3): 1504-1516

KUMAR D, HACKER TA, BUCK J, WHITESELL LF, KAJI EH, DOUGLAS PS, KAMP TJ (2005)

Distinct mouse coronary anatomy and myocardial infarction consequent to ligation.

Coron Artery Dis; 16(1): 41-44

KUNO N, KADOMATSU K, FAN QW, HAGIHARA M, SENDA T, MIZUTANI S, MURAMATSU T (1998)

Female sterility in mice lacking the basigin gene, which encodes a transmembrane glycoprotein belonging to the immunoglobulin superfamily.

FEBS Lett; 425: 191-194

LEV M, THAEMERT J (1973)

The conduction system of the mouse heart.

Acta Anat; 342-352

LI H, CYBULSKY MI, GIMBRONE MA Jr., LIBBY P (1993)

An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leucocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium.

Arterioscler Thromb; 13(2): 197-204

LI M, ZHAI Q, BHARADWAJ U, WANG H, LI F, FISHER WE, CHEN C, YAO Q (2006)

CypA is overexpressed in human pancreatic cancer cells and stimulates cell proliferation through CD147.

Cancer; 106(10): 2284-2294

LI R, HUANG L, GUO H, TOOLE BP (2001)

Basigin (murine CD147) stimulates matrix metalloproteinase production by fibroblasts.

J Cell Physiol; 186: 371-379

LI YY, FELDMAN AM, SUN Y, MCTIERNAN CF (1998)

Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart.

Circ; 98(17): 1728-1734

- LIM M, MARTINEZ T, JABLONS D, CAMERON R, GUO H, TOOLE B, LI JD, BASBAUM C (1998)
Tumor-derived CD147 (extracellular matrix metalloproteinase inducer) stimulates collagenase transcription through MAPK p38.
FEBS Lett; 441: 88-92
- LINDSEY M, WEDIN K, BROWN MD, KELLER C, EVANS AJ, SMOLEN J, BURNS AR, ROSSEN RD, MICHAEL L, ENTMAN M (2001)
Matrix-dependent mechanism of neutrophil-mediated release and activation of matrix metalloproteinase 9 in myocardial ischemia/reperfusion.
Circ; 103: 2181-2187
- LINDSEY ML, ESCOBAR GP, DOBRUCKI LW, GOSHORN DK, BOUGES S, MINGOIA JT, MCCLISTER DM, SU H, GANNON J, MACGILLIVRAY C, LEE RT, SINUSAS AJ, SPINALE FG (2006)
Matrix metalloproteinase-9 gene deletion facilitates angiogenesis after myocardial infarction.
Am J Physiol Heart Circ Physiol; 290: H232-H239
- LIU J, ALBERS MW, WANDLESS TJ, LUAN S, ALBERG DG, BELSHAW PJ, COHEN P, MAC KINTOSH C, KLEE CB, SCHREIBER SL (1992)
Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity.
Biochemistry; 31(16): 3896-3901
- LOPSHIRE JC, ZIPES DP (2006)
Sudden cardiac death: better understanding of risks, mechanisms, and treatment.
Circ; 114: 1134-1136
- LUQMAN N, SUNG RJ, WANG C, KUO C (2007)
Myocardial ischemia and ventricular fibrillation: pathophysiology and clinical implications.
Int J Cardiol; 119: 283-290
- LUSIS AJ (2000)
Atherosclerosis.
Nature; 407: 233-241
- LUSIS AJ, MAR R, PAJUKANTA P (2004)
Genetics of atherosclerosis.
Annu Rev Genomics Hum Genet; 5: 189-218
- MASINI E, CUZZOCREA S, MAZZON E, MARZOCCA C, MANNAIONI PF, SALVEMINI D (2002)
Protective effects of M40403, a selective superoxide dismutase mimetic, in myocardial ischaemia and reperfusion injury in vivo.
Brit J Pharmacol; 137(8): 1378-1387
- MAXWELL SRJ, LIP GYH (1996)
Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options.
Int J Cardiol; 58: 95-117

MAXWELL SRJ, LIP GYH (1997)

Free radicals and antioxidants in cardiovascular disease.

Brit J Clin Pharmacol; 44: 307-317

MEHTA D, CURWIN J, GOMES A, FUSTER V (1997)

Sudden death in coronary artery disease: acute ischemia versus myocardial substrate.

Circ; 96: 3215-3223

MICHAEL LH, BALLANTYNE CM, ZACHARIAH JP, GOULD KE, POCIUS JS, TAFFET GE, HARTLEY CJ, PHAM TT, DANIEL SL, FUNK E, ENTMAN ML (1999)

Myocardial infarction and remodeling in mice: effect of reperfusion.

Am J Physiol Heart Circ Physiol; 277: 660-668

MICHAEL LH, ENTMAN ML, HARTLEY CJ, YOUKER KA, ZHU J, HALL SR, HAWKINS HK, BERENS K, BALLANTYNE CM (1995)

Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model.

Am J Physiol; 269(6 Pt 2): H2147-H2154

MIKI T, LIU GS, COHEN MV, DOWNEY JM (1998)

Mild hypothermia reduces infarct size in the beating rabbit heart: a practical intervention for acute myocardial infarction?

Basic Res Cardiol; 93(5): 372-383

MIYAUCHI T, MASUZAWA Y, MURAMATSU T (1991)

The basigin group of the immunoglobulin superfamily: complete conservation of a segment in and around transmembrane domains of human and mouse basigin and chicken HT7 antigen.

J Biochem; 110(5): 770-774

MOELLER LC, DUMITRESCU AM, REFETOFF S (2005)

Cytosolic action of thyroid hormone leads to induction of hypoxia-inducible factor-1alpha and glycolytic genes.

Mol Endocrinol; 19: 2955-2963

MURAMATSU T, MIYAUCHI T (2003)

Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion.

Histol Histopathol; 981-987

NAGASE H, WOESSNER JF Jr. (1999)

Matrix metalloproteinases.

J Biol Chem; 274(31): 21491-21494

NAKAI M, CHEN L, NOWAK RA (2006)

Tissue distribution of Basigin and Monocarboxylate Transporter 1 in the adult male mouse: a study using the wild-type and Basigin gene knockout mice.

The Anatomical Record Part A; 288A: 527-535

NARDO LG, NIKAS G, MAKRIGIANNAKIS A (2003)

Molecules in blastocyst implantation. Role of matrix metalloproteinases, cytokines and growth factors.

J Reprod Med; 48(3): 137-147

NARUHASHI K, KADOMATSU K, IGAKURA T, FAN QW, KUNO N, MURAMATSU H, MIYAUCHI T, HASEGAWA T, ITOH A, MURAMATSU T, NABESHIMA T (1997)
Abnormalities of sensory and memory functions in mice lacking CD147 gene.
Biochem.Biophys Res Commun; 236(3): 733-737

NAYLER WG, ELZ JS (1986)
Reperfusion injury: laboratory artifact or clinical dilemma?
Circ; 74: 215-221

NIGAM A, KOPECKY SL (2002)
Therapeutic potential of monoclonal antibodies in myocardial reperfusion injury.
Am J Cardiovasc Drugs; 2(6): 367-376

NOGUCHI Y, SATO T, HIRATA M, HARA T, OHAMA K, ITO A (2003)
Identification and characterization of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human endometrium during the menstrual cycle in vivo and in vitro.
J Clin Endocrinol Metab; 88(12): 6063-72

OCHRIETOR JD, MOROZ TM, KADOMATSU K, MURAMATSU T, LINSER PJ (2001)
Retinal degeneration following failed photoreceptor maturation in 5A11/Basigin null mice.
Exp. Eye Res; 72: 467-477

ORTEGA N, BEHONICK DJ, STICKENS D, WERB Z (2003)
How proteases regulate bone morphogenesis.
Ann NY Acad Sci; 995: 109-116

ORTEGA N, BEHONICK DJ, WERB Z (2004)
Matrix remodeling during enchondral ossification.
Trends Cell Biol; 14(2): 86-93

PATTEN RD, ARONOWITZ MJ, DERAS-MEJIA L, PANDIAN NG, HANAK GG, SMITH JJ, MENDELSON ME, KONSTAM MA (1998)
Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction.
Am J Physiol Heart Circ Physiol; 274: 1812-1820

PEISER L, MUKHOPADHYAY S, GORDON S (2002)
Scavenger receptors in innate immunity.
Current Opinions in Immunology; 14: 123-128

PHILP NJ, OCHRIETOR JD, RUDOY C, MURAMATSU T, LINSER PJ (2003)
Loss of MCT1, MCT3 and MCT4 expression in the retinal pigment epithelium and neural retina of the 5A11/Basigin-null mouse.
Invest Ophthalmol Vis Sci; 44: 1305-1311

PINHEIRO C, LONGATTO-FILHO A, SIMÕES K, JACOB CE, BRESCIANI CJ, ZILBERSTEIN B, CECCONELLO I, ALVES VA, SCHMITT F, BALTAZAR F (2009)
The prognostic value of CD147/CD147 is associated with monocarboxylate transporter 1 co-expression in gastric cancer.
Eur J Cancer; 45(13): 2418-2424

POOLE RC, HALESTRAP AP (1993)

Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes.
Am J Physiol; 264(4 Pt 1): C761-C782

PUSHKARSKY T, YURCHENKO V, VANPOUILLE C, BRICHACEK B, VAISMAN I, HATAKEYAMA S, NAKAYAMA KI, SHERRY B, BUKRINSKY MI (2005)

Cell surface expression of CD147/CD147 is regulated by cyclophilin 60.
J Biol Chem; 280: 27866-27871

PUSHKARSKY T, ZYBARTH G, DUBROVSKI L, YURCHENKO V, TANG H, GUO H, TOOLE B, SHERRY B, BUKRINSKY M (2001)

CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated CypA.
Proc Natl Acad Sci USA; 98(11): 6360-6365

REIMER KA, JENNINGS RB, HILL ML (1981)

Total ischemia in dog hearts, in vitro 2. High energy phosphate depletion and associated defects in energy metabolism, cell volume regulation, and sarcolemmal integrity.
Circ Res; 49: 901-911

RICHARDSON JC, KENDAL CE, ANDERSON R, PRIEST F, GOWER E, SODEN P, GRAY R, TOPPS S, HOWLETT DR, LAVENDER D, CLARKE NJ, BARNES JC, HAWORTH R, STEWART MG, RUPNIAK HTR (2003)

Ultrastructural and behavioural changes precede amyloid deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease.
Neuroscience; 122: 213-228

RIES C, PETRIDES P (1995)

Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and regulatory dysfunction in disease.
Biol Chem Hoope Seyler; 376(6): 345-355

ROMANIC AM, HARRISON SM, BAO W, BURNS-KURTIS CL, PICKERING S, GU J, GRAU E, MAO J, SATHE GM, OHLSTEIN EH, YUE T (2002)

Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by targeted deletion of matrix metalloproteinase-9.
Cardiovasc Res; 549-558

ROSENBERG GA, CUNNINGHAM LA, WALLACE J, ALEXANDER S, ESTRADA EY, GROSSETETE M, RAZHAGI A, MILLER K, GEARING A (2001)

Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat brain: activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures.
Brain Res; 893(1-2): 104-112

ROSENTHAL EL, SHREENIVAS S, PETERS GE, GRIZZLE WE, DESMOND R, GLADSON CL (2003)

Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in laryngeal squamous cell carcinoma.
Laryngoscope; 113: 1406-1410

SATOH K, MATOBA T, SUZUKI J, O'DELL MR, NIGRO P, CUI Z, MOHAN A, PAN S, LI L, JIN Z, YAN C, ABE J, BERK BC (2008)

CypA mediates vascular remodeling by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation.

Circ; 117: 3088-3089

SATOH K, NIGRO P, MATOBA T, O'DELL MR, CUI Z, SHI X, MOHAN A, YAN C, ABE J, ILLIG KA, BERK BC (2009)

CypA enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin II-induced aortic aneurysms.

Nat Med; 15(6): 649-656

SAXENA DK, OH-OKA T, KADOMATSU K, MURAMATSU T, TOSHIMORI K (2002)

Behaviour of a sperm surface transmembrane glycoprotein basigin during epididymal maturation and its role in fertilization in mice.

Reproduction; 123: 435-444

SCHLOSSHAUER B, HERZOG KH (1990)

Neurothelin: an inducible cell surface glycoprotein of blood-brain barrier- specific endothelial cells and distinct neurons.

J Cell Biol; 110(4): 1261-1274

SCHMIDT R, REDECKE V, BREITFELD Y, WANTIA N, MIETHKE T, MASSBERG S, FISCHER S, NEUMANN FJ, SCHOMIG A, MAY AE (2006)

CD147 (CD147) is a central activator of extracellular matrix degradation by Chlamydia pneumoniae-infected monocytes. Implications for plaque rupture.

Thromb Haemost; 95(1): 151-158

SCHMIDT R, BÜLTMANN A, UNGERER M, JOGHETAEI N, BÜLBÜL Ö, THIEME S, CHAVAKIS T, TOOLE BP, GAWAZ M, SCHÖMIG A, MAY AE (2006)

Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer regulates matrix metalloproteinase activity in cardiovascular cells: implications in acute myocardial infarction.

Circ; 113: 834-841

SCHWARTZ SM, GALIS ZS, ROSENFELD ME, FALK E (2007)

Plaque rupture in humans and mice.

Arterioscler Thromb Vasc Biol; 27: 705-713

SEKO Y, FUJIMURA T, TAKA H, MINEKI R, MURAYAMA K, NAGAI R (2004)

Hypoxia followed by reoxygenation induces secretion of CypA from cultured rat cardiac myocytes.

Biochem Biophys Res Commun; 317(1): 162-168

SEMENZA GL (2000)

HIF-1: Using two hands to flip the angiogenic switch.

Cancer Metastasis Rev; 19(1-2): 59-65

SEULBERGER H, LOTTSPEICH F, RISAU W (1992)

The inducible blood-brain barrier specific molecule HT7 is a novel immunoglobulin-like cell surface glykoprotein.

EMBO J; 11: 2151-2158

SHAH PK, FALK E, BADIMON JJ, FERNANDEZ OA, MAILHAC A, VILLAREAL-LEVY G, FALLON JT, REGNSTROM J, FUSTER V (1995)

Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture.

Circ, 92: 1565-1569

SHERRY B, YARLETT N, STRUPP A, CERAMI A (1992)

Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages.

Proc Natl Acad Sci USA; 89(8): 3511-3515

SKALEN K, GUSTAFSSON M, RYDBERG EK, HULTEN LM, WIKLUND O (2002)

Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis.

Nature, 417: 750-754

SMITH JD, TROGAN E, GINSBERG M, GRIGAUX C, TIAN J, MIYATA M (1995)

Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor and apolipoprotein e.

Proc Natl Acad Sci USA; 92: 8264-8268

SPERTI G, VAN LEEUWEN RT, QUAX PH, MASERI A, KLUFT C (1992)

Cultured rat aortic vascular smooth muscle cells digest naturally produced extracellular matrix. Involvement of plasminogen-dependent and plasminogen-independent pathways.

Circ Res; 71(2): 385-392

SPINALE FG, COKER ML, HEUNG LJ, BOND BR, GUNASINGHE HR, ETOH T, GOLDBERG AT, ZELLNER JL, CRUMBLEY AJ (2000)

A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure.

Circ; 102: 1944-1949

STEENBERGEN C, HILL ML, JENNINGS RB (1985)

Volume regulation and plasma membrane injury in aerobic, anaerobic, and ischemic myocardium in vitro. Effects of osmotic cell swelling on plasma membrane integrity.

Circ Res; 57: 864-875

STEFFENSEN B, HAKKINEN L, LARJAVA H (2001)

Proteolytic events of wound-healing – coordinated interactions among matrix metalloproteinases, integrins, extracellular matrix molecules.

Crit Rev Oral Biol Med; 12(5): 373-398

SUEHIRO K, TAKUMA S, SHIMIZU J, HOZUMI T, YANO H, CARDINALE C, DITULLIO MR, WANG J, SMITH CR, BURKHOFF D, HOMMA S (2001)

Assessment of left ventricular systolic function using contrast two-dimensional echocardiography with a high-frequency transducer in the awake murine model of myocardial infarction.

Jpn Circ J; 65(11): 979-983

SWIRSKI FK, NAHRENDORF M, ETZRODT M, WILDGRUBER M, CORTEZ-RETAMOZO V, PANIZZI P, FIGUEIREDO J, KOHLER RH, CHUDNOVSKIY A, WATERMAN P, AIKAWA E, MEMPEL TR, LIBBY P, WEISSLEDER R, PITTET MJ (2009)

Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*; 325: 612-616

TAKAHASHI S, BARRY AC, FACTOR SM (1990)

Collagen degradation in ischemic rat hearts.

Biochem J; 265: 233-241

TANG Y, KESAVAN P, NAKADA MT, YAN L (2004)

Tumor-stroma interaction: Positive feedback regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) expression and matrix metalloproteinase-dependent generation of soluble CD147.

Mol Cancer Res; 2: 73-80

TANG Y, NAKADA MT, KESAVAN P, McCABE F, MILLAR H, RAFFERTY P, BUGELSKI P, YAN L (2005)

Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases.

Cancer Res; 65: 3193-3199

TAO Z, CAVASIN MA, YANG F, LIU Y, YANG X (2004)

Temporal changes in matrix metalloproteinase expression and inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice.

Life Sciences; 74: 1561-1572

TARNAVSKI O, McMULLEN JR, SCHINKE M, NIE Q, KONG S, IZUMO S (2004)

Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies.

Physiol Genomics; 16: 349-360

TEGEDER I, SCHUMACHER A, JOHN S, GEIGER H, GEISSLINGER G, BANG H, BRUNE K (1997)

Elevated serum cyclophilin levels in patients with severe sepsis.

J Clin Immunol; 17(5): 380-386

TOMITA T, NAKASE T, KANEKO M, SHI K, TAKAHI K, OCHI T, YOSHIKAWA H (2002)

Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis.

Arthritis Rheum; 46(2): 373-378

TOYAMA Y, MAEKAWA M, KADOMATSU K, MIYAUCHI T, MURAMATSU T, YUASA S (1999)

Histological characterization of defective spermatogenesis in mice lacking the basigin gene.

Anat. Histol. Embryol; 28: 205-213

- TSAI WC, SHEU LF, NIEH S, YU CP, SUN GH, LIN YF, CHEN A, JIN JS (2007)
Association of CD147 and fascin expression in renal cell carcinoma: correlation with clinicopathological parameters.
World J Urol; 25: 73-80
- VAN DEN BOS EJ, BAREND ME, DE WAARD MC, DE CROM R, DUNCKER DJ (2005)
A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation.
Am J Physiol Heart Circ Physiol; 289: H1291-1300
- VERDOUW PD, VAN DEN DOEL MA, DE ZE UW S, DUNCKER DJ (1998)
Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes.
Cardiovasc Res; 39(1): 121-135
- VERMA S, FEDAK WM, WEISEL RD, BUTANY J, RAO V, MAITLAND A, LI R, DHILLON B, YAU TM (2002)
Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist.
Circ; 105: 2332-2336
- VISSE R, NAGASE H (2003)
Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry.
Circ Res; 92(8): 827-839
- VOIGT H, VETTER-KAUCZOK CS, SCHRAMA D, HOFMANN UB, BECKER JC, HOUBEN R (2009)
CD147 impacts angiogenesis and metastasis formation.
Cancer Invest; 27: 329-333
- WEBB S, BROWN NA, ANDERSON RH (1996)
The structure of the mouse heart in late fetal stages.
Anat Embryol Berl; 194(1): 37-47
- WU T, LIN S, WEISS JN, TING C, CHEN P (2002)
Two types of ventricular fibrillation in isolated rabbit hearts: importance of excitability and action potential duration restitution.
Circ; 106: 1859-1866
- XU Q, LEIVA MC, FISCHKOFF SA, HANDSCHUMACHER RE, LYTTLE CR (1992)
Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin.
J Biol Chem; 267(17): 11968-11971
- YAN G, PARK T, CORR PB (1995)
Activation of thrombin receptor increase intracellular Na⁺ during myocardial ischemia.
Am J Physiol Heart Circ Physiol; 268: 1740-1748
- YANG F, CHEN Y, SU J (2008)
The role of CD147 in the proliferation, activation and chemotaxis of Jurkat cell induced by CypA.
Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi; 29(12): 793-796

YOUKER KA, HAWKINS HK, KUKIELKA GL, PERRARD JL, MICHAEL LH, BALLANTYNE CM, SMITH CW, ENTMAN ML (1994)

Molecular evidence for induction of intracellular adhesion molecule-1 in the viable border zone associated with ischemia-reperfusion injury of the dog heart.

Circ; 89(6): 2736-2746

YOUNG SG, PARTHASARATHY S (1994)

Why are low density lipoproteins atherogenic?

West J Med; 160(2): 153-164

YURCHENKO V, CONSTANT S, BUKRINSKY M (2005)

Dealing with the family: CD147 interactions with cyclophilins.

Immunol; 117: 301-309

YURCHENKO V, O'CONNOR M, DAI WW, GUO H, TOOLE B, SHERRY B, BUKRINSKY M (2001)

CD147 is a signaling receptor for cyclophilin B.

Biochem Biophys Res; 288: 786-788

YURCHENKO V, ZYBARTH G, O'CONNOR M, DAI WW, FRANCHIN G, HAO T, GUO H, HUNG H, TOOLE B, GALLAY B, SHERRY B, BUKRINSKY M (2002)

Active site residues of CypA are crucial for its signaling activity via CD147.

J Biol Chem; 277: 22959-22965

ZAVADZKAS JA, PLYLER RA, BOUGES S, KOVAL CN, RIVERS WT, BECK CU, CHANG EI, STROUD RE, MUKHERJEE R, SPINALE FG (2008)

Cardiac-restricted overexpression of extracellular matrix metalloproteinase inducer causes myocardial remodeling and dysfunction in aging mice.

Am J Physiol Heart Circ Physiol; 295: H1394-H1402

ZHANG F, VANNUCCI SJ, PHILP NJ, SIMPSON IA (2005)

Monocarboxylate transporter expression in the spontaneous hypertensive rat: effect of stroke.

J Neurosci Res; 79: 139-145

ZHENG HC, TAKAHASHI M, MURAI Y, CUI ZG, NOMOTO K, MIWA S, TSUNEYAMA K, TAKANO Y (2006)

Upregulated CD147/CD147 might contribute to growth and angiogenesis of gastric carcinoma: a good marker for local invasion and prognosis.

Br J Cancer; 95: 1371-1378

ZHU C, WANG X, DEINUM J, HUANG Z, GAO J, MODJTAHEDI N, NEAGU MR, NILSSON M, ERIKSSON PS, HAGBERG H, LUBAN J, KROEMER G, BLOMGREN K (2007)

CypA participates in the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in neurons after cerebral hypoxia-ischemia.

JEM; 204(8): 1741-1748

ZHOU S, ZHOU H, WALIAN PJ, JAP BK (2005)

CD147 is a regulatory subunit of the γ -Sekretase complex in Alzheimer's disease amyloid β -peptide production.

Proc Natl Acad Sci USA; 102: 7499-7504

ZHU P, DING J, ZHOU J, DONG W, FAN C, CHEN Y (2005)

Expression of CD147 on monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis: its potential role in monocyte accumulation and matrix metalloproteinase production.

Arthritis Research & Therapy; 7: R1023-R1033

ZHU W, KHACHI S, HAO Q, SHEN F, YOUNG WL, YANG G, CHEN Y (2008)

Upregulation of CD147 after permanent focal cerebral ischemia.

Neurochem Int; 52: 1086-1091

ZOLOTAREVA AG, KOGAN ME (1978)

Production of experimental occlusive myocardial infarction in mice.

Cor Vasa; 20(4): 308-314

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München (Stand: 09.01.2010)

www.path.med.tum.de/studenten/unterlagen/sd_atherosklerose.pdf

Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz e.V. (Stand: 25.08.2009)

www.tierschutz-tvt.de/merkblaetter.html

8. TABELLENVERZEICHNIS

Tab.1: Übersicht über die Versuchsdurchführung	33
Tab.2: Übersicht über aufgetretene Komplikationen während des Versuchszeitraums	62
Tab.3: Allgemeine Daten der Versuchsnummer 1 sowie Einzelergebnisse der Infarktgrößenbestimmung	63
Tab.4: Allgemeine Daten der Versuchsnummer 2	68
Tab.5: Einzelwerte des FAC jeder untersuchten Maus in Versuch 2	69
Tab.6: Einzelwerte der Infarktgrößen von Versuch 2	70
Tab.7: Allgemeine Daten der Versuchsnummer 3 sowie Einzelergebnisse der Infarktgrößenbestimmung	75
Tab.8: Allgemeine Daten der Versuchsnummer 4	80
Tab.9: Darstellung der FAC-Einzelwerte aus Versuch 4	81
Tab.10: Einzelwerte der Infarktgrößenbestimmung bei Versuch 4	83
Tab.11: Allgemeine Daten von Versuch 5 sowie Einzelergebnisse der myokardialen Ischämie/Reperfusion	87
Tab.12: Allgemeine Daten der Versuchsnummer 6	91
Tab.13: Arithmetische Mittel des FAC bei Versuch 6	92
Tab.14: Einzelwerte der Infarktgrößenbestimmung bei Versuch 6	94

9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb.1: Strukturmodell des CD147-Proteins (aus MURAMATSU T, MIYAUCHI T 2003)	10
Abb.2: Interaktionen zwischen CD147 und CypA (aus YURCHENKO V et al. 2005)	16
Abb.3: Abnormitäten der CD147 ^{+/-} -Maus	19
Abb.4: auf Tumorzellen exprimiertes CD147 (modifiziert nach TANG Y et al. 2005)	21
Abb.5: CD147-abhängige MCT-Expression auf der Zellmembran (modifiziert nach IANOCO KT et al. 2007)	22
Abb.6: Exemplarische Bandenbildung nach Gelelektrophorese	31
Abb.7: Instrumente und Geräte	35
Abb.8: Vorbereitung und Lagerung der Maus	36
Abb.9: Tracheotomie und Intubation	37
Abb.10: Durchführung der Thorakotomie	39
Abb.11: Ligatur der LAD	40
Abb.12: Verschluss der Thorakotomie- und Tracheotomiewunde	41
Abb.13: Evans Blue-Färbung	43
Abb.14: Aufbereitung und Auswertung der Herzen nach Myokardinfarkt	44
Abb.15: Quantifizierung der Infarktnarbe	45
Abb.16: Infarktnarbe und Ischämiegebiet 24 Stunden nach myokardialer Ischämie/Reperfusion	46
Abb.17: Bestimmung der enddiastolischen Flächen des linken Ventrikels	48
Abb.18: CD147 ^{+/+} -Mäuse zeigen eine höhere Dichte an CD147-positiven Splenozyten	58
Abb.19: Die Anzahl CD147-positiver Splenozyten ist bei CD147 ^{+/-} -Mäusen vermindert	59
Abb.20: Die Dichte CD147-positiver Hepatozyten ist bei CD147 ^{+/-} -Mäusen vermindert	60

Abb.21: Die myokardiale MMP9-Aktivität von CD147 ^{+/-} -Mäusen ist im Trend verringert	61
Abb.22: Bezogen auf das Ischämiegebiet haben CD147 ^{+/-} -Mäuse eine im Trend verringerte Infarktgröße	64
Abb.23: Bezogen auf die Fläche des linken Ventrikels ist die Infarktgröße bei CD147 ^{+/-} -Mäusen im Trend verringert	65
Abb.24: Der Anteil der AaR an der Gesamtfläche des linken Ventrikels ist in Versuchs- und Kontrollgruppe annähernd gleich	65
Abb.25: In den Infarkttrandzonen der CD147 ^{+/-} -Mäuse ist eine geringere Dichte an Zellkernen erkennbar	66
Abb.26: Die enzymatische Aktivität der MMPs sind 24 Stunden nach myokardialer Ischämie/Reperfusion erhöht, zeigen aber keine signifikanten Unterschiede zwischen CD147 ^{+/-} -Mäusen und Wildtypkontrollen	67
Abb.27: CD147 ^{+/-} -Mäuse haben sieben Tage nach myokardialer Ischämie/Reperfusion eine signifikant weniger beeinträchtigte Herzfunktion	69
Abb.28: CD147 ^{+/-} -Mäuse haben sieben Tage nach myokardialer Ischämie/Reperfusion eine signifikant verringerte Infarktgröße	71
Abb.29: Der Anteil des Infarkts an der Fläche des linken Ventrikels ist bei CD147 ^{+/-} -Mäusen sieben Tage nach myokardialer Ischämie/Reperfusion signifikant verringert	72
Abb.30: Die mittleren Anteile der AaR an der Fläche des linken Ventrikels ergeben bei Versuchs- und Kontrollgruppe keinen Unterschied	73
Abb.31: Mit längerer Dauer der Reperfusion verringert sich die mittlere Infarktgröße bei der CD147 ^{+/-} -Maus	73
Abb.32: Die echokardiographisch bestimmte linksventrikuläre Verkürzungsfraction (%FAC) verbessert sich mit abnehmender Fläche des Infarkts	74
Abb.33: Die Dichte an Zellkernen in der Infarkttrandzone ist bei der CD147 ^{+/-} -Maus sieben Tage nach myokardialer Ischämie/Reperfusion signifikant reduziert	74
Abb.34: Der prozentuale Anteil des Infarktgebietes an der Ausdehnung der AaR ist bei denen mit antiCD147-Antikörper behandelten Mäusen 24 Stunden nach myokardialer Ischämie/Reperfusion signifikant verringert	76
Abb.35: Bezogen auf die Fläche des linken Ventrikels ist das Infarktareal bei denen mit antiCD147-Antikörper behandelten Mäusen 24 Stunden nach myokardialer Ischämie/Reperfusion signifikant verringert	77

Abb.36: Der prozentuale Anteil der AaR an der Fläche des linken Ventrikels weist keinen signifikanten Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe auf	78
Abb.37: Die MMP9-Aktivität im Myokard von antiCD147-Antikörper behandelten Mäusen ist 24 Stunden nach Operation gegenüber der Kontrollgruppe verringert	78
Abb.38: Neben einer deutlich kleineren Infarktnarbe ist bei den mit antiCD147-Antikörper behandelten Mäusen eine geringere Dichte an Zellkernen im Infarktgebiet erkennbar	79
Abb.39: Die Herzfunktion einer mit antiCD147-Antikörper behandelten Maus ist sieben Tage nach Operation weniger stark beeinträchtigt	81
Abb.40: Mit antiCD147-Antikörper behandelte Mäuse haben sieben Tage nach Operation eine signifikant weniger stark eingeschränkte Herzfunktion	82
Abb.41: Mit antiCD147-Antikörper behandelte Mäuse haben sieben Tage nach Operation ein signifikant geringeres Infarktareal	83
Abb.42: Der Anteil der Infarktausdehnung an der Fläche des linken Ventrikels ist sieben Tage nach myokardialer Ischämie/Reperfusion bei mit antiCD147-Antikörper behandelten Mäusen signifikant geringer	84
Abb.43: Die Areale der ischämischen Bereiche sind bei Versuchs- und Kontrollgruppe nicht signifikant unterschiedlich	85
Abb.44: Mit längerer Dauer der Reperfusion bleiben die Infarktareale der anti-CD147-Antikörper behandelten Mäuse nahezu unverändert, wohingegen sich die Infarktflächen der Isotypkontrollen verringern	85
Abb.45: Mit abnehmender Infarktgröße (%I/AaR) verbessert sich das FAC und somit die Kontraktionskraft des Herzens	86
Abb.46: Bei den mit antiCD147-Antikörper behandelten Mäusen ist sieben Tage nach Operation eine verminderte Dichte an Zellkernen, die sich im Infarktgebiet befinden, erkennbar	86
Abb.47: Bezogen auf das Ischämiegebiet ist die Infarktgröße der CypA ^{-/-} Maus signifikant verringert	88
Abb.48: Die Infarktgröße im Verhältnis zum linken Ventrikel ist bei der CypA ^{-/-} Maus signifikant vermindert	89
Abb.49: Die jeweiligen Ischämiegebiete sind bei CypA ^{-/-} Mäusen und der Kontrollgruppe nicht signifikant abweichend	90
Abb.50: Neben einer deutlich kleineren Infarktnarbe ist bei CypA ^{-/-} Mäusen eine geringere Dichte an Zellkernen im Infarktgebiet erkennbar	90

Abb.51: Die linksventrikuläre Verkürzungsfraction ist bei CypA ^{-/-} Mäusen sieben Tage nach myokardialer Ischämie/Reperfusion weniger stark beeinträchtigt	92
Abb.52: Die Herzfunktion der CypA ^{-/-} Mäuse ist sieben Tage nach myokardialer Ischämie/Reperfusion gegenüber der Kontrollgruppe signifikant weniger eingeschränkt	93
Abb.53: Die Infarktfläche im Verhältnis zur AaR ist bei CypA ^{-/-} Mäusen signifikant verringert	95
Abb.54: Bezogen auf die Fläche des linken Ventrikels ist das Infarktareal bei CypA ^{-/-} Mäusen signifikant verringert	96
Abb.55: Die prozentualen Anteile der AaR am linken Ventrikel sind zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe nicht signifikant unterschiedlich	97
Abb.56: Die Dichte an Zellkernen ist bei CypA ^{-/-} Mäusen geringer als bei der Wildtypkontrolle	97
Abb.57: Mögliche Normvarianten der LAD (aus MICHAEL LH et al. 1995)	100
Abb.58: Korrelation zwischen Infarktgröße sowie linksventrikulärer Herzfunktion und Anzahl der Zellen in der Infarkttrandzone	109

10. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AaR	„area at risk“
AaR/LV	Verhältnis „area at risk“ zu linkem Ventrikel
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
AnaR	„area non at risk“
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	albumin bovine serum
CD147	Bezeichnung für EMMPRIN
CD147 ^{-/-}	Basigin-knockout-Maus
CD147 ^{+/-}	heterozygote Basigin-Maus
CD147 ^{+/+}	Wildtypkontrolle aus der Kolonie
bzw.	beziehungsweise
C57Bl/6	Wildtyp-Labormaus
Ca ²⁺	Kalzium
CypA	Cyclophilin A
DIC	disseminated intravascular coagulation (Verbrauchskoagulopathie)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	extrazelluläre Matrix
EMMPRIN	extracellular matrix metalloproteinase inducer
ERK½	Bezeichnung einer MAP-Kinase
et al.	et altera
Fa.	Firma

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

FAC	„fractional area change“
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
gp42	Bezeichnung für CD147 in der Maus
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1 α	hypoxia-inducible factor 1 α
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
HT7	Bezeichnung für CD147 im Huhn
I	Infarkt
I/AaR	Verhältnis Infarkt zur „area at risk“
I/LV	Verhältnis Infarkt zu linkem Ventrikel
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LAD	left anterior descending artery
LDL	low-density-lipoprotein
LV	Linker Ventrikel
LVEDF	linksventrikuläre enddiastolische Fläche
LVESF	linksventrikuläre endsystolische Fläche
M	Mol
M6	Bezeichnung für CD147 im Menschen
MAP	mitogen-activated protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP-1	monocyte chemoattractant proteins-1
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
MCT	Monocarboxylat-Transporter
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
ml	Milliliter
mm	Millimeter

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MMP	matrix metalloproteinase
Mn-SOD	Mangan-Superoxid-Dismutase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MT-MMP	membrangebundene Matrix Metalloproteinase
MW	arithmetrischer Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
ox-47	Bezeichnung für CD147 in der Ratte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p38	Bezeichnung einer MAP-Kinase
PAF	Thrombozyten-aktivierender Faktor
PBS	phosphat buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule-1
pH	pH-Wert = negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMN	polymorphkernige Neutrophile
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
RNA	Ribonukleinsäure
SEM	standard error of mean
SOD	Superoxid-Dismutase
Tab.	Tabelle
TCSF	tumor cell-derived collagenase stimulatory factor
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothel growth factor
VLDL	very-low-density-lipoprotein
WHO	world health organisation

11. DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. Stangassinger für die Übernahme der Dissertation an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München und seine freundliche Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Mein Dank gilt Univ.-Prof. Dr. med. M. Gawaz, Direktor des Instituts für Kardiologie und Kreislauferkrankungen des UKT Tübingen, für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. A. E. May danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas und die geduldige Durchsicht des Manuskripts.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. P. Seizer für die gute Zusammenarbeit, die jederzeit gewährte freundliche Beratung und die Hilfestellung, sowie das außergewöhnliche Engagement während der Arbeit an dem gemeinsamen Projekt.

Herzlich gedankt sei Frau Dr. med. vet. T. Schönberger für die allzeit gewährte liebenswürdige Hilfe, die konstruktiven Ratschläge und ihre enorme Geduld bei der gewissenhaften Korrektur des Manuskripts.

Der Arbeitsgruppe um Univ.-Prof. Dr. med. M. Gawaz danke ich herzlich für die anregenden Diskussionen, Hilfestellungen während der Arbeit an diesem Projekt und die konstruktive Kritik.

Nicht unerwähnt bleiben sollten alle anderen Mitarbeiter des Labors für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die gute Zusammenarbeit, freundschaftliche Unterstützung und ihre verständnisvolle Motivation.

Ein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. S. Engelhardt und seiner Arbeitsgruppe für die nette Zusammenarbeit bei der Durchführung der Echokardiographie.

Herrn S. Zach danke ich für die gelungene Zusammenarbeit an diesem Projekt.

All meinen Freunden danke ich für die verständnisvolle Unterstützung und die große Geduld.

Meinen Eltern möchte ich für die liebenswürdige Unterstützung in jeglicher Hinsicht danken. Ohne sie wären meine Ausbildung und die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.